

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE
CLEMBUTEROL EM URINA E PLASMA DE EQUINOS POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

PROJETO DE FINAL DE CURSO

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA
ENGENHARIA QUÍMICA

ORIENTADORES

TATIANA FELIX FERREIRA, D.Sc.
RAFAEL GARRETT DA COSTA, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
AGOSTO DE 2020

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE
CLEMBUTEROL EM URINA E PLASMA DE EQUINOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente
da Escola de Química/UFRJ, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

ORIENTADORES

TATIANA FELIX FERREIRA, D.Sc.
RAFAEL GARRETT DA COSTA, D.Sc.

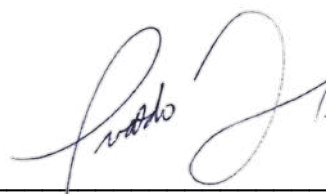
RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
AGOSTO DE 2020

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE
CLEMBUTEROL EM URINA E PLASMA DE EQUINOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente
da Escola de Química/UFRJ, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

APROVADO POR:



IVALDO ITABAIANA JUNIOR, D. Sc.

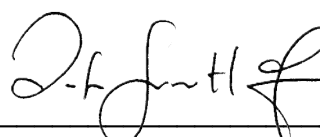


MARINA AMARAL ALVES, D. Sc.

ORIENTADO POR:



TATIANA FELIX FERREIRA, D.Sc.



RAFAEL GARRETT DA COSTA, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
AGOSTO DE 2020

Silva, Thiago Saraiva de Sá

Desenvolvimento e validação de um método de detecção de clembuterol em urina e plasma de equinos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas / Thiago Saraiva de Sá Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020.

xv, 119 p.; il.

Projeto de Final de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadores: Tatiana Felix Ferreira e Rafael Garrett da Costa.

1. Controle de dopagem. 2. Equinos. 3. Clembuterol. 4. Métodos analíticos. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Espectrometria de massas. 7. Projeto de Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 8. Tatiana Felix Ferreira. 9. Rafael Garrett da Costa. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à toda minha família por todo o suporte e incentivo dado na minha vida acadêmica, desde o início do curso técnico em química até agora, no final da graduação em engenharia química.

À Dra. Nathália Oliveira Cavalcanti Zúniga pela oportunidade e confiança de me escolher para estagiar no LAB RES e poder desenvolver esse projeto de final de curso, proporcionando treinamentos e ensinamentos sobre os equipamentos, validação de métodos analíticos e a organização laboratorial.

À equipe do LAB RES, contando com os analistas, técnicos químicos e estagiários, que ajudaram no ensinamento do procedimento e das técnicas utilizadas e pela companhia do dia a dia, deixando o ambiente de trabalho muito agradável.

Aos meus orientadores Tatiana Felix Ferreira e Rafael Garrett da Costa por embarcarem comigo nesse projeto de final de curso e por dedicarem seus tempos e dedicações nas correções e orientações na escrita do trabalho.

Ao espaço físico da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com o Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico que proporcionou os equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento do projeto.

Por último, a todos que possam ter contribuído direta ou indiretamente na minha caminhada durante a graduação até eu chegar aqui.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE CLEMBUTEROL EM URINA E PLASMA DE EQUINOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

AGOSTO DE 2020

ORIENTADORES: TATIANA FELIX FERREIRA, D.Sc.
RAFAEL GARRETT DA COSTA, D.Sc.

RESUMO

O controle de dopagem em cavalos de corrida tem importância fundamental nas competições esportivas a fim de obter resultados justos e eliminar animais irregulares, segundo normas definidas por federações equinas internacionais. Com esse intuito, métodos analíticos instrumentais são desenvolvidos para a identificação das substâncias proibidas nos fluidos biológicos dos cavalos, como o caso do clembuterol, molécula alvo desse trabalho. Para a realização do desenvolvimento e validação do método para a detecção de clembuterol, foram utilizadas amostras de urina e plasma de equinos, onde já tinha sido identificada a ausência de quaisquer substâncias proibidas. As amostras passaram por uma extração líquido-líquido, seguindo a metodologia já adotada no Laboratório de Análise de Resíduos (LAB RES), para obtenção dos padrões de clembuterol e padrão interno fortificados em matriz. Após essa etapa, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas do tipo QTRAP (CLAE-EM/EM), onde foram realizados diversos testes para a validação do método, como: seletividade, limite de detecção, interferência da matriz, repetitividade, capacidade de identificação, rendimento de extração, arraste e robustez. O método foi validado com sucesso, obtendo um limite de detecção do clembuterol de 0,2 ng/mL em urina e 0,025 ng/mL em plasma. Um novo método de análise, utilizando a metodologia EM/EM/EM (EM3), foi sugerida para reduzir o limite de detecção do clembuterol somente na matriz de urina, que não alcançou os limites definidos pelas federações equinas internacionais de 0,1 ng/mL.

Palavras-chaves: controle de dopagem, equinos, clembuterol, métodos analíticos, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE CLEMBUTEROL EM URINA E PLASMA DE EQUINOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

THIAGO SARAIVA DE SÁ SILVA

AGOSTO DE 2020

ORIENTADORES: TATIANA FELIX FERREIRA, D.Sc.
RAFAEL GARRETT DA COSTA, D.Sc.

ABSTRACT

Doping control in racehorses is the utmost importance in sport competitions to obtain reliable results and eliminate irregular animals, according to international equine federations. For this purpose, analytical methods have been developed to identify the illegal substances in the biological fluids of horses, such as clenbuterol, the target molecule of this study. In order to develop and validate the method to analyze clenbuterol, urine and plasma samples from horses containing no illegal substances were used. A liquid-liquid extraction was performed according to the methodology used at the Laboratório de Análise de Resíduos (LAB RES) to obtain the matrix standards of clenbuterol and the internal standard. Then, the samples were analyzed by high-performance liquid chromatograph coupled to a QTRAP mass spectrometer (HPLC-MS/MS), performing several tests to validate the method, such as: selectivity, detection limit, matrix interference, repeatability, identification capability, extraction yield, drag and robustness. The method was successfully validated, obtaining a clenbuterol detection limit of 0,2 ng/mL in urine and 0,025 ng/mL in plasma. A new method with MS/MS/MS (MS3) methodology was proposed to reduce the clenbuterol detection limit only in the urine matrix, that did not reach the limits set by international equine federations of 0,1 ng/mL.

Keywords: doping control, horses, clenbuterol, analytical methods, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do clenbuterol (1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-(terc-butilamino)etanol).....	5
Figura 2 – Compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.....	9
Figura 3 – Ionização das partículas por <i>electrospray</i> (ESI) na fonte do EM.....	11
Figura 4 – Esquema do método de aquisição com MRM e EPI.....	14
Figura 5 – Fórmula estrutural da 7-propilteofilina (1,3-dimetil-7-propilpurina-2,6-diona).....	15
Figura 6 – Diagrama de blocos do procedimento padrão realizado nas amostras analisadas.....	21
Figura 7 – Diagrama de blocos da etapa de <i>Clean up</i> em urina de equinos.....	23
Figura 8 – (a) Tubos com amostras pré- <i>Clean up</i> e (b) tubos <i>falcon</i> com filtro de 0,2 μm	24
Figura 9 – (a) Cuba de extração e (b) tubos com amostras pós- <i>Clean up</i>	25
Figura 10 – Diagrama de blocos da extração líquido-líquido em meio básico em urina de equinos.....	26
Figura 11 – Diagrama de blocos da extração líquido-líquido em meio básico em plasma de equinos.....	28
Figura 12 – (a) Tubos com amostras de plasma e (b) tubos <i>safe-lock</i> Eppendorf.....	29
Figura 13 – Posição da tubulação de plástico para otimização e da coluna cromatográfica no CLAE.....	34
Figura 14 – Possível rota de fragmentação do clenbuterol.....	42
Figura 15 – Possível rota de fragmentação da 7-propilteofilina.....	43
Figura 16 – Cromatogramas da análise cromatográfica com duração de 14 minutos: (a) fragmentos do clenbuterol e o fragmento mais intenso da 7-propilteofilina; (b) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (c) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina.....	44
Figura 17 – Cromatogramas da análise cromatográfica com duração de 11 minutos: (a) fragmentos do clenbuterol e o fragmento mais intenso da 7-propilteofilina; (b) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (c) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina.....	45
Figura 18 – Teste da seletividade para a matriz de urina, Branco 01: (a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.....	46

Figura 19 – Teste da seletividade para a matriz de plasma, Branco 01: (a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.....	47
Figura 20 – Esquema do método de aquisição com MS3.....	60
Figura 21 – Cromatograma da nova proposta de análise cromatográfica para as amostras de urina: (a) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina no modo +MRM; (b) fragmentos 203,0, 132,0 e 168,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (c) fragmentos 132,0 e 168,0 Da do clenbuterol no modo +MS3.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do clenbuterol.....	6
Tabela 2 – Peças do compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.....	9
Tabela 3 – Posição da <i>TurbolonSpray Probe</i> para diferentes vazões de operação.....	31
Tabela 4 – Parâmetros da fonte de ionização otimizados pela FIA.....	33
Tabela 5 – Gradiente da análise cromatográfica de 14 minutos.....	34
Tabela 6 – Gradiente da análise cromatográfica de 11 minutos.....	35
Tabela 7 – Valores tabelados do teste de Grubbs para $p = 0,025$ e n amostras.....	39
Tabela 8 – Janelas de tolerância máxima para intensidade relativa entre íons e tempo de retenção.....	39
Tabela 9 – Alterações no procedimento de extração para o teste de robustez nas amostras de urina e plasma.....	41
Tabela 10 – Otimização dos parâmetros dependentes do clenbuterol.....	42
Tabela 11 – Otimização dos parâmetros dependentes da 7-propilteofilina.....	43
Tabela 12 – Otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	44
Tabela 13 – Relação sinal/ruído para o teste do limite de detecção nas amostras de urina e plasma.....	48
Tabela 14 – Relação sinal/ruído para a confirmação do limite de detecção nas amostras de urina e plasma.....	49
Tabela 15 – Média e desvio padrão para o teste da interferência da matriz nas amostras de urina e plasma.....	50
Tabela 16 – Dispersão dos resultados no teste de repetitividade nas amostras de urina e plasma.....	51
Tabela 17 – Razão entre as áreas e os resultados do teste de Grubbs para avaliação dos valores aberrantes no teste da repetitividade nas amostras de urina e plasma....	51
Tabela 18 – Avaliação da capacidade de identificação para a matriz de urina.....	53
Tabela 19 – Avaliação da capacidade de identificação para a matriz de plasma.....	54
Tabela 20 – Razão das áreas do analito e padrão interno para o rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.....	55
Tabela 21 – Razões entre as áreas e os resultados do teste de Grubbs para avaliação dos valores aberrantes no teste do rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.....	56

Tabela 22 – Resultados do rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.	56
Tabela 23 – Resultados do teste do arraste nas amostras de urina e plasma.....	57
Tabela 24 – Resultados do teste da robustez para o Grupo 01 nas amostras de urina e plasma.....	58
Tabela 25 – Resultados do teste da robustez para o Grupo 02 nas amostras de urina e plasma.....	59
Tabela 26 – Relação sinal/ruído do novo teste do limite de detecção nas amostras de urina.....	63
Tabela 27 – Relação sinal/ruído para a confirmação do LD do novo teste realizado para amostras de urina.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF2 – Energia de excitação
AORC – *Association of Official Racing Chemists*
ARCI – *Association of Racing Commissioners International*
BR – Branco de reagente
CAD – *Collisionally Activated Dissociation Gas*
CCS – Centro de Ciências da Saúde
CE – *Collision Energy*
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CG – Cromatógrafo Gasoso
CLAE – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CLAE-EM – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas
CLAE-EM/EM – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas híbrido quadrupolo-armadilha de íons
COI – Comitê Olímpico Internacional
CQNC – Controle negativo de urina
CQNP – Controle negativo de plasma
CQPC – Controle positivo de urina
CQPP – Controle positivo de plasma
CUR – *Curtain Gas*
CXP – *Collision Cell Exit Potential*
DP – *Declustering Potential*
ELL – Extração líquido-líquido
EM – Espectrômetro de Massas
EPI – *Enhanced Product Ion*
ESI – *Electrospray Ionization*
ESL – Extração sólido-líquido
FIA – *Flow Injection Analysis*
GS1 – *Ion Source Gas 1*
GS2 – *Ion Source Gas 2*
HPLC – *High-Performance Liquid Chromatograph*

HPLC-MS – *High-Performance Liquid Chromatograph coupled to the Mass Spectrometer*

HPLC-MS/MS – *High-Performance Liquid Chromatograph coupled to ion-quadrupole hybrid Mass Spectrometry*

IFHA – *International Federation of Horseracing Authorities*

ILAC – *International Laboratory Accreditation Cooperation*

IQ – Instituto de Química

IS – *IonSpray Voltage*

ISL – *International Screening Limit*

LAB RES – Laboratório de Análise de Resíduos

LADETEC – Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

LBCD – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

LD – Limite de detecção

LIT – *Linear Ion Trap*

MRM – *Multiple Reaction Monitoring*

m/z – Razão massa/carga

P.I. – Padrão Interno

S/N – Relação sinal/ruído

TBME – Éter metil-terc-butílico

TCA – Ácido tricloroacético

TEM – *Temperature*

t_r – Tempo de retenção

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

WADA – *World Anti-Doping Agency*

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1) Controle de dopagem no esporte.....	3
2.1.1) Controle de dopagem em equinos.....	4
2.2) Substâncias proibidas.....	4
2.2.1) Clembuterol.....	5
2.2.1.1) Clembuterol em equinos.....	6
2.3) Validação de um método qualitativo.....	7
2.3.1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	8
2.3.2) Espectrômetro de massas.....	9
2.3.2.1) Parâmetros do espectrômetro de massas.....	12
2.3.2.1.1) Parâmetros dependentes do composto.....	12
2.3.2.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	12
2.3.2.2) Construção de um método de aquisição de dados.....	13
2.3.3) Padrão interno para um método qualitativo.....	14
2.3.4) Testes para a validação de um método qualitativo.....	15
3) OBJETIVOS.....	17
4) MATERIAIS, REAGENTES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS.....	18
4.1) Materiais.....	18
4.2) Reagentes.....	19
4.3) Padrões.....	20
4.4) Equipamentos.....	20
5) METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	21
5.1) Procedimento de extração líquido-líquido em meio básico.....	22
5.1.1) Etapa de <i>Clean up</i> em urina de equinos.....	23
5.1.2) Etapa de extração em urina de equinos.....	25
5.1.3) Etapa de extração em plasma de equinos.....	27
5.2) Validação do método qualitativo.....	29
5.2.1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	29
5.2.2) Espectrômetro de massas.....	30
5.2.2.1) Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	31

5.2.2.1.1) Parâmetros dependentes do composto.....	31
5.2.2.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	32
5.2.3) Desenvolvimento do gradiente da análise cromatográfica.....	34
5.2.4) Construção do método final de aquisição de dados.....	35
5.2.5) Testes para a validação do método qualitativo.....	36
5.2.5.1) Seletividade.....	36
5.2.5.2) Limite de detecção.....	36
5.2.5.3) Interferência da matriz.....	37
5.2.5.4) Repetitividade.....	38
5.2.5.5) Capacidade de identificação.....	39
5.2.5.6) Rendimento de extração.....	39
5.2.5.7) Arraste.....	40
5.2.5.8) Robustez.....	41
6) RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
6.1) Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	42
6.1.1) Parâmetros dependentes do composto.....	42
6.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização.....	43
6.2) Desenvolvimento do gradiente da análise cromatográfica.....	44
6.3) Testes para a validação do método qualitativo.....	46
6.3.1) Seletividade.....	46
6.3.2) Limite de detecção.....	47
6.3.3) Interferência da matriz.....	49
6.3.4) Repetitividade.....	50
6.3.5) Capacidade de identificação.....	52
6.3.6) Rendimento de extração.....	55
6.3.7) Arraste.....	57
6.3.8) Robustez.....	58
7) PROPOSTAS DE MELHORIA PARA O MÉTODO QUALITATIVO.....	60
7.1) Novo método de aquisição.....	60
7.2) Novo gradiente da cromatografia líquida.....	61
7.3) Determinação do novo limite de detecção.....	62
8) CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ANEXO A – APROVAÇÃO DA PESQUISA CIENTÍFICA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	71
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS PARA O TESTE DA SELETIVIDADE.....	72
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS PARA O TESTE DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	82
APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS PARA A CONFIRMAÇÃO DO LD.....	90
APÊNDICE D – CROMATOGRAMAS PARA O NOVO TESTE DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	100
APÊNDICE E – CROMATOGRAMAS PARA A CONFIRMAÇÃO DO LD DO NOVO TESTE.....	110

1) INTRODUÇÃO

A prática esportiva possui uma importância fundamental na sociedade, e com ela, a necessidade de competições justas e regulamentadas. Um exemplo são as corridas de cavalos, denominadas de Turfe, que ganham seu destaque pela movimentação da economia local com as casas de apostas legais. Para que não ocorra fraudes nos resultados, com cavalos que possam estar sob a influência de substâncias proibidas, um controle de dopagem se torna necessário para a eliminação desses animais das competições.

Federações equinas internacionais já listaram o uso de mais de 500 substâncias proibidas em competições. Entre elas, o clenbuterol, molécula alvo deste projeto, considerado um agente anabólico para os animais. As principais federações são a ARCI (*Association of Racing Commissioners International*) e a IFHA (*International Federation of Horseracing Authorities*), cada uma definindo um limite que essas substâncias podem ser encontradas nos organismos dos cavalos.

Com o surgimento de novas moléculas proibidas e o baixo limite de concentração permitido, se tornou necessário o desenvolvimento de novos métodos analíticos instrumentais, para o controle de dopagem desse esporte, pelo laboratório em que o trabalho foi realizado. Para a detecção desses compostos em urina e plasma de equinos, geralmente são utilizados instrumentos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).

O equipamento utilizado no projeto foi o cromatógrafo líquido da Agilent 1260 Infinity e o espectrômetro de massas da Sciex QTRAP 5500. Ambos geram um alto nível de sensibilidade, ao utilizar técnicas de análise do tipo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), onde são detectados somente os fragmentos da molécula investigada. Para matrizes como a urina e plasma de equinos, onde uma variedade enorme de substâncias estão presentes, essa técnica leva uma vantagem frente a outras, uma vez que o equipamento pode diferenciar substâncias de mesma massa molecular pela fragmentação das moléculas.

O presente projeto foi realizado no Laboratório de Análise de Resíduos (LAB RES), associado ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), situado na Ilha do Fundão, Rio de Janeiro.

O LADETEC é uma associação de diversos laboratórios que possuem um parque moderno para pesquisas e prestação de serviços, legado dos Jogos Olímpicos Rio 2016. Faz parte do LADETEC, o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), que possui como a principal atividade o controle de dopagem em humanos em diferentes esportes usando como matriz amostras de urina e sangue. O LAB RES é o laboratório responsável pelo controle de dopagem em cavalos de corrida, assim como, análises de resíduos e contaminantes em animais produtores de alimentos. O LAB RES possui, até o momento, a acreditação pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 de laboratórios de ensaio e calibração para o escopo de controle de dopagem em urina e plasma de equinos.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Controle de dopagem no esporte

Historicamente no controle de dopagem no esporte, foi observado que desde o início do século passado, diversos casos onde atletas sobre os efeitos de substâncias não permitidas, definidas por órgãos de controle, ganham uma vantagem significativa contra seus adversários. Com o avanço da tecnologia de análise instrumental, novos compostos começam a ser descobertos e sintetizados, demandando um desenvolvimento de novas técnicas para o controle dessas substâncias proibidas.

Em 1952 e 1956, nas Olimpíadas de Helsinki e Melbourne, respectivamente, o abuso das drogas foi caracterizado devido à competidores de corrida sobre patins que passaram mal com o uso de anfetaminas, mas não coibido até o momento. Em 1960, um conselho da Europa, reunindo 22 nações, elaborou uma resolução contra o uso de agentes dopantes no esporte. Em 1967, o Comitê Olímpico Internacional (COI) estabeleceu sua comissão médica, realizando o primeiro controle de dopagem nas Olimpíadas de inverno de Grenoble e nas Olimpíadas do México, ambas em 1968 (RADLER, 2001).

No primeiro ano com um controle de dopagem, foram elaborados testes simples com foco nos estimulantes. Nessa olimpíada, o primeiro e único caso de doping, ocorreu com um atleta sueco da equipe de pentatlo, devido ao consumo de cervejas antes da competição (ENTINI, 2012). Com o passar dos anos, novas técnicas foram inseridas no controle de dopagem como a cromatografia em fase gasosa (CG), nas Olimpíadas de Munique em 1972; e o espectrômetro de massas acoplado ao CG, nas Olimpíadas de Los Angeles em 1984. O espectrômetro de massas possibilitou o controle de esteroides anabolizantes, como a testosterona, em todas as amostras obtidas nessa Olimpíada (RADLER, 2001).

No ano 2000, ocorreu a criação da Agência Mundial Antidopagem (WADA, *World Anti-Doping Agency*), que criou uma lista de substâncias proibidas e classificou os compostos de acordo com o seu efeito. Foram estabelecidos limites de concentrações que certas substâncias podem ser encontradas nos fluidos biológicos de atletas, ou até a ausência total de outras, em diversos esportes.

2.1.1) Controle de dopagem em equinos

Assim como a WADA regulamenta o controle de dopagem em atletas humanos, existem outras instituições que fiscalizam o uso de substâncias proibidas em cavalos de corrida. Entre elas, a ARCI formada em 1934, composta pelos reguladores governamentais de diversos países; e a IFHA fundada em 1993, reúne cerca de sessenta membros com o propósito de coordenar suas ações para proteger a integridade das corridas de cavalo e manter seu objetivo básico, selecionar os melhores cavalos nas competições para melhorar a qualidade da criação.

Hoje em dia, a IFHA aponta somente cinco laboratórios no mundo como laboratórios de referência em controle de dopagem equina, localizados na Austrália, Estados Unidos, França, Hong Kong e Inglaterra. Assim como a WADA, também é definido limites de concentrações máximas que podem ser encontradas em amostras de urina e plasma de equinos, o ISL (*International Screening Limit*).

2.2) Substâncias proibidas

Segundo a WADA, as substâncias proibidas são divididas em três grupos: A) substâncias proibidas e que não podem ser utilizadas, mesmo fora do período de competição; B) substâncias proibidas somente durante as competições; e C) compostos proibidos em alguns esportes em particular (WADA, 2019). Dentro de cada um desses grupos, existem subgrupos separados de acordo com o efeito apresentado por cada substância no organismo, listados abaixo:

- A) S0: Substâncias não aprovadas;
 - S1: Agentes anabólicos;
 - S2: Hormônios de peptídeos, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticas;
 - S3: Agonistas beta-2;
 - S4: Moduladores de hormônio e metabólitos;
 - S5: Diuréticos e agentes de mascaramento;

- B) S6: Estimulantes;
 S7: Narcóticos;
 S8: Canabinoides;
 S9: Glicocorticoides;

C) P1: Bloqueadores beta.

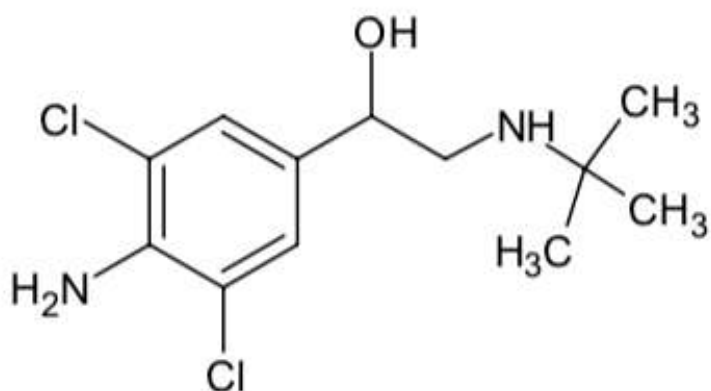
Dentre as substâncias proibidas listadas pela WADA, encontra-se o clenbuterol, molécula alvo do presente estudo.

2.2.1) Clenbuterol

O clenbuterol é um fármaco broncodilatador que atua sobre os receptores β_2 da musculatura brônquial, desenvolvido para o tratamento de doenças pulmonares crônicas. Ele supostamente melhora a capacidade respiratória do animal, mas seu uso foi considerado como doping pelo efeito colateral anabolizante que apresenta (FERRAZ, 2006).

O clenbuterol está enquadrado no grupo S1 de substâncias proibidas pela WADA, os agentes anabólicos. Devido seu efeito colateral, é muitas vezes utilizado por criadores e veterinários de forma incorreta para o esporte, sem ser com o intuito de tratar uma doença pulmonar. Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 1 e algumas propriedades físico-químicas na Tabela 1.

Figura 1 – Fórmula estrutural do clenbuterol (1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-(terc-butilamino)etanol).



Fonte: Autoria própria com utilização do ChemSketch (2019).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do clenbuterol.

Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O
Massa monoisotópica	276,08 g/mol
Temperatura de fusão	174-175,5°C
Solubilidade em água	0,112 mg/mL
pKa (Ácido mais forte)	14,06
pKa (Base mais forte)	9,63

Fonte: DrugBank (2019).

A IFHA possui em seu banco de dados o valor do ISL do clenbuterol, em urina hidrolisada, de 0,1 ng/mL, porém não possui informações sobre o plasma (INTERNATIONAL SCREENING LIMITS-URINE, 2019). A ARCI já possui um valor do limite de tolerância de 0,14 ng/mL em urina, ou qualquer nível de detecção em plasma. Além disso, traz informações como o período de 14 dias para que o organismo do animal elimine todo o composto (ARCI CONTROLLED THERAPEUTIC MEDICATION SCHEDULE FOR HORSES, 2017).

2.2.1.1) Clenbuterol em equinos

De acordo com Lima (2004, p. 54), em sua dissertação de mestrado em metrologia da PUC-Rio, o laboratório para controle de dopagem em matrizes biológicas de animais de competição do Jockey Club Brasileiro, utiliza um método chamado “Hidrofra” para detecção de clenbuterol. O método foi desenvolvido no “Laboratoire LAB – Contrôle antidopage”, situado na França, utilizado para detecção de substâncias excretadas sob as formas gluco- e sulfoconjugadas e encontradas nos fluidos biológicos, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

O método é composto por quatro etapas: hidrólise enzimática; extração em cartucho de fase sólida Narc-2 por solvente orgânico; evaporação do solvente de eluição; e derivação do resíduo obtido. Além do clenbuterol, é possível detectar com esse método substâncias como: acebutolol, codeína, propanolol, terbutalina, xilazina, entre outros.

Por outro lado, Guan et al. (2002) publicaram na revista *Rapid Communication in Mass Spectrometry* formas de quantificação de clenbuterol em plasma, urina e

tecidos de equinos. O método envolve uma extração líquido-líquido, separação das substâncias por cromatografia líquida e monitoramento de pseudo-reações múltiplas (pseudo-MRM) por espectrometria de massas com quadrupolo-tempo-de-voo e ionização por *electrospray* (ESI-QTOF-MS/MS).

O intervalo de quantificação de clenbuterol do método foi de 0,013 a 10 ng/mL em plasma, 0,5 a 200 ng/mL em urina e 0,025 a 10 ng/g em tecido de equinos. O limite de detecção de clenbuterol do método foi de 13 pg/mL em plasma, 0,5 ng/mL em urina e 25 pg/g em tecido. Este método é útil para a detecção e quantificação de concentrações muito baixas de clenbuterol em amostras de urina, plasma e tecido de equinos.

Lehner et al. (2001) realizaram o desenvolvimento de um método de confirmação e quantificação de clenbuterol em plasma de equinos. Eles sintetizaram clenbuterol-d9 para ser utilizado como padrão interno, junto a um método automatizado de extração em fase sólida, e ambos foram utilizados em conjunto a uma cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de monitoramento de reações múltiplas (CLAE-EM/EM).

Tradicionalmente, as análises para controle de dopagem em equinos dependem das análises em urina, devido ao pequeno volume de amostras de plasma e às baixas concentrações de medicamentos encontrados nessas matrizes. Usando a metodologia CLAE-EM/EM, agora é possível identificar e quantificar baixas concentrações (10 pg/mL) de drogas no plasma. Com base na velocidade com que novos métodos podem ser desenvolvidos e na confiança com que as descobertas podem ser aplicadas na situação forense, essa abordagem oferece vantagens científicas e regulatórias consideráveis em relação às abordagens mais tradicionais de análise em urina, visto que a redução do seu limite de detecção é maior (LEHNER et al., 2001).

2.3) Validação de um método qualitativo

Para a construção de um método de análise instrumental qualitativo eficiente e seguro, de forma a garantir o resultado obtido, existem diversos requerimentos e critérios definidos por organizações nacionais e internacionais que devem ser seguidos para a realização do mesmo. No Brasil, temos o INMETRO, que possui o

documento DOQ-CGCRE-008 intitulado “Orientação sobre validação de métodos analíticos”.

Já internacionalmente, existem organizações já voltadas para os animais que participam de competições de corrida, como a *Association of Official Racing Chemists* (AORC), com o documento intitulado “*AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry*”. A AORC utiliza como referência para a construção dos seus guias, as orientações de outra instituição, chamada *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC), com o documento ILAC-G7:02/2016, que possui o nome “*Accreditation Requirements and Operating Criteria for Horseracing Laboratories*”.

A validação do método proposto por esse trabalho seguiu as orientações e critérios desses três documentos citados. O método consiste em uma extração líquido-líquido da substância de interesse com posterior análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas.

2.3.1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência

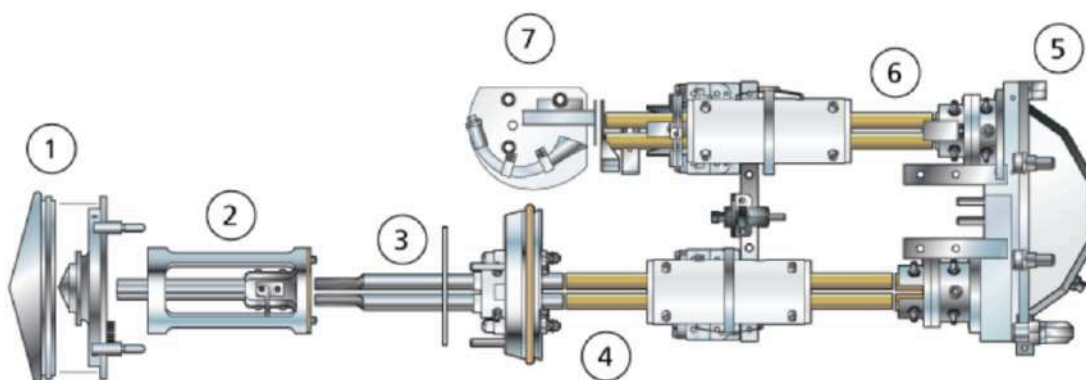
O objetivo principal de uma cromatografia líquida de alta eficiência é a separação de solutos em uma amostra. Para isso, é utilizada uma coluna cromatográfica onde está presente a fase estacionária que pode ser líquida ou sólida. A fase estacionária líquida é adsorvida ou imobilizada sobre um suporte sólido, enquanto que a fase estacionária sólida é o próprio preenchimento da coluna. A fase móvel líquida, contendo a amostra de interesse, é, então, bombeada através da coluna e diversos possíveis mecanismos de interação entre as fases fazem com que as moléculas se separem, sendo eluídas em tempos de retenção diferentes.

Um dos tipos de mecanismo de separação da fase estacionária utilizados é de partição com fase ligada, onde um composto de cadeia carbônica, C8 ou C18, foi imobilizado por ligações químicas na fase estacionária. Ela funciona em fase reversa, ou seja, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. A separação das moléculas ocorre pela diferença de polaridade entre elas, sendo umas mais retidas pela coluna do que outras (SILVA, 2014).

2.3.2) Espectrômetro de massas

A espectrometria de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e fornecer informações sobre as propriedades estruturais e químicas das moléculas (SCIEX, 2017). O compartimento interno de um espectrômetro de massas do tipo QTRAP, como o 5500 da Sciex por exemplo, está representado na Figura 2 com suas peças detalhadas na Tabela 2.

Figura 2 – Compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.



Fonte: *System User Guide*, Sciex (2017).

Tabela 2 – Peças do compartimento interno do QTRAP 5500 da Sciex.

Item	Descrição
1	<i>Orifice plate</i>
2	<i>QJet ion guide</i>
3	Região Q0
4	Quadrupolo Q1
5	Célula de colisão Q2
6	Quadrupolo Q3
7	Detector

Fonte: *System User Guide*, Sciex (2017).

O software que controla esse modelo citado é o Analyst. Ele controla o espectrômetro de massa e o sistema de cromatografia líquida para a aquisição de dados processados. Durante a operação do sistema, os dados adquiridos são

enviados ao software Analyst, onde podem ser mostrados como espectros de massa total, intensidade de um único íon, assim como múltiplos íons juntos, ao longo do tempo ou a contagem total de íons pelo tempo (SCIEX, 2017).

O espectrômetro de massas QTRAP 5500 da Sciex é um modelo híbrido, que possui uma série de lentes, que focalizam e transmitem os íons, e dois analisadores de massas sequenciais (do tipo quadrupolo e armadilha de íons) que analisam os íons de acordo com a razão m/z . O *QJet ion guide*, localizado entre a *orifice plate* e a região Q0 não filtra os íons, mas os concentra antes que entrem no próximo quadrupolo. Ao focar o maior fluxo de íons criado pela *orifice plate*, o *QJet ion guide* aumenta a sensibilidade do sistema e melhora a relação sinal-ruído. Na região Q0, os íons são novamente focados antes de passar para o quadrupolo Q1 (SCIEX, 2017).

O quadrupolo Q1 é um quadrupolo de filtragem que seleciona os íons antes que eles entrem na célula de colisão Q2. A célula de colisão Q2 é onde a energia interna de um íon é aumentada por meio de colisões com moléculas de gás, a ponto das ligações moleculares quebrarem, criando fragmentos. Essa técnica permite que os usuários projetem experimentos que medem a m/z dos fragmentos para determinar a estrutura do precursor (SCIEX, 2017).

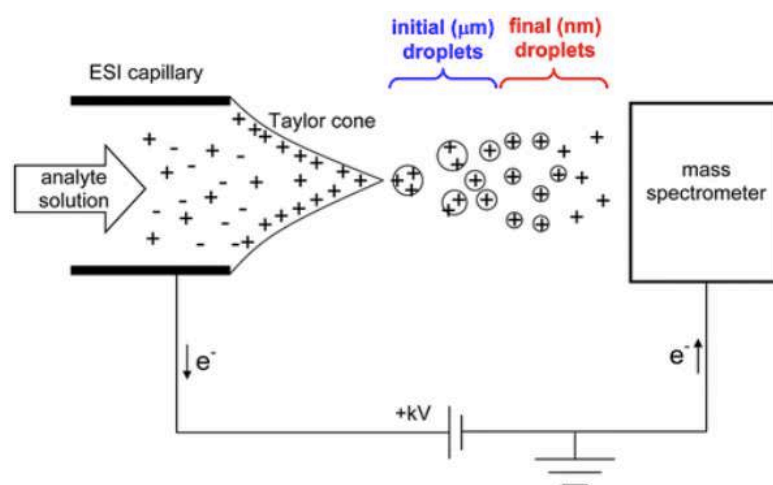
Depois de passar pela célula de colisão Q2, os íons entram no quadrupolo Q3 (uma armadilha de íons; *ion trap*) para uma filtragem adicional, entrando no detector somente uma m/z de cada vez. No detector, os íons criam uma corrente que é convertida em um pulso de voltagem, sendo diretamente proporcionais à quantidade de íons que entram no detector. O sistema monitora esses pulsos e depois converte as informações em um sinal que representa a intensidade do íon para um valor de m/z específico e o sistema mostra essa informação como um espectro de massas (SCIEX, 2017).

A funcionalidade *Ion Trap Linear* (LIT) fornece vários modos de operação aprimorados. Um fator em comum entre eles é que os íons ficam aprisionados dentro do analisador de massas, devido a voltagens específicas, e depois são liberados para o detector. Muitos espectros são coletados em um curto período de tempo, sendo significativamente mais intensos do que os espectros coletados em um modo de operação de quadrupolo tradicional (SCIEX, 2017).

A fonte de ionização do equipamento QTRAP 5500 da Sciex se chama *Turbo V Ion Source*. Ela opera com a *TurbolonSpray Probe*, que funciona com vazão de

solvente de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 3000 $\mu\text{L}/\text{min}$. A *TurbolonSpray Probe* está localizada centralmente com os dois aquecedores turbo colocados a um ângulo de 45° de cada lado. As amostras introduzidas através da probe são ionizadas dentro da tubulação, pela aplicação de uma alta voltagem, e depois nebulizadas pelo jato de gás de nitrogênio quente, seco e de alta pureza criando uma névoa de pequenas gotas altamente carregadas (SCIEX, 2014), como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Ionização das partículas por *electrospray* (ESI) na fonte do EM.



Fonte: Konermann et al. (2013).

A ESI (*Electrospray Ionization*) ocorre a partir das gotículas emitidas pelo cone de Taylor que sofrem rápida evaporação do solvente, muitas vezes auxiliadas pelo aquecimento. A densidade de carga nas partículas que estão evaporando se acumula, até que a tensão superficial seja equilibrada pela repulsão Coulômbica. Esse é o chamado limite de Rayleigh, onde são produzidas gotas ainda menores e de alta carga por fissão a jato. Eventos repetidos de evaporação e fissão produzem nano gotas que geram os analitos na fase gasosa detectados pelo espectrômetro de massas (KONERMANN, 2013).

2.3.2.1) Parâmetros do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas possui dois tipos de parâmetros otimizáveis que são: os parâmetros dependentes do composto e os parâmetros dependentes da fonte de ionização. A definição de cada parâmetro otimizável está a seguir (SCIEX, 2017).

2.3.2.1.1) Parâmetros dependentes do composto

O software Analyst otimiza os parâmetros dependentes do composto por meio de uma injeção direta e contínua da molécula de interesse por infusão, para obter a máxima sensibilidade do mesmo. A infusão é realizada por uma seringa, com um tubo de plástico conectado a fonte de ionização e um motor para manter o fluxo constante. Durante a otimização, ele seleciona o íon precursor e seus fragmentos, otimizando o DP (*Declustering Potential*), CE (*Collision Energy*) e CXP (*Collision Cell Exit Potential*).

- DP: controla a voltagem na *orifice plate*. É utilizado para minimizar os aglomerados de solvente que podem permanecer nos íons da amostra depois que eles entram na câmara de vácuo. Quanto maior a voltagem, maior a energia transmitida aos íons, podendo ocorrer fragmentação indesejada se for muito alto.
- CE: controla a diferença de potencial entre a região Q0 e a célula de colisão Q2. É a quantidade de energia que o íon precursor recebe sendo acelerado para dentro da Q2, onde ele colide com moléculas de gás e fragmenta.
- CXP: controla a voltagem no fim da célula de colisão Q2. Esse parâmetro transmite os íons para o quadrupolo Q3.

2.3.2.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização

A otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização ocorre com a injeção da molécula pelo amostrador automático, onde um pequeno volume de padrão é inserido na tubulação do cromatógrafo líquido, junto com a fase móvel, e é analisado pelo espectrômetro de massas. Dessa forma, são otimizados os parâmetros da fonte de ionização, de modo a obter a maior sensibilidade para o composto. Os parâmetros

são: CUR (*Curtain Gas*), IS (*Ion Spray Voltage*), TEM (*Temperature*), GS1 (*Ion Source Gas 1*), GS2 (*Ion Source Gas 2*) e CAD (*Collisionally Activated Dissociation Gas*).

- CUR: controla o fluxo de gás da interface *curtain gas*, localizada entre a *curtain plate* e o orifício. Evita a contaminação da ótica iônica.
- IS: controla a voltagem aplicada ao eletrodo na *TurbolonSpray Probe*, que ioniza a amostra na fonte de ionização. O parâmetro depende da polaridade e afeta a estabilidade e sensibilidade do spray.
- TEM: controla a temperatura do gás de aquecimento da *TurbolonSpray Probe*.
- GS1: controla o gás do nebulizador para a *TurbolonSpray Probe*.
- GS2: controla o gás do aquecedor para a *TurbolonSpray Probe*.
- CAD: controla a pressão do gás de dissociação na célula de colisão Q2 para diversas funções, como: focar os íons à medida que passam pelo Q2, fragmentar os íons precursores e prender os íons na *linear ion trap*.

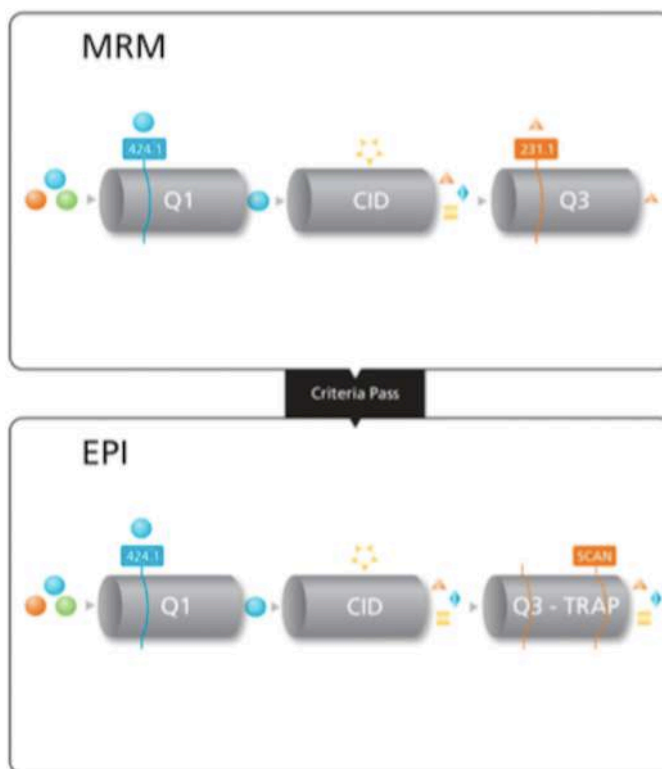
2.3.2.2) Construção de um método de aquisição de dados

Existem diversos tipos de experimentos para a construção de um método de aquisição de dados no espectrômetro de massas híbrido QTRAP. Eles são divididos em dois grupos: modo quadrupolo e modo *linear ion trap*. Foi utilizado nesse projeto de final de curso a varredura do tipo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) do modo quadrupolo e o EPI (*Enhanced Product Ion*) do modo *linear ion trap*.

O MRM consiste na seleção do íon definido pelo usuário no Q1 e a transmissão desse para o Q2, onde ocorre a fragmentação pelo gás de dissociação. O Q3 seleciona o fragmento pré-selecionado e envia para o detector. Esse modo de varredura é utilizado principalmente para quantificação. O EPI possui as mesmas etapas iniciais do MRM, porém todos os fragmentos são capturados no Q3 e são enviados para o detector. Esse tipo de varredura é usado para obter um espectro de alta qualidade de um íon produto, normalmente utilizados para medições qualitativas (SCIEX, 2017).

A Figura 4 mostra um esquema hipotético de como funcionam ambos os tipos de varredura no método de aquisição utilizado no experimento.

Figura 4 – Esquema do método de aquisição com MRM e EPI.



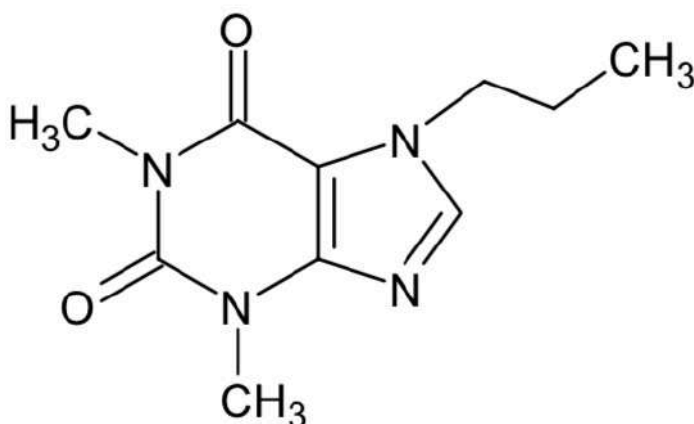
Fonte: *Using Your QTRAP LC/MS/MS System at Full Potential*, Sciex (2013).

2.3.3) Padrão interno para um método qualitativo

O método de análise instrumental qualitativo, utilizando um padrão interno (PI), consiste na adição de uma quantidade conhecida de uma substância de referência, na solução dos padrões analíticos e na amostra. O uso do padrão interno corrige variações no sinal analítico devido a mudanças nas condições de análise, utilizando como parâmetro a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno.

A 7-propilteofilina foi escolhida como PI por não reagir com nenhum componente da amostra, possuir um tempo de retenção próximo do analito e por possuir uma similaridade estrutural e propriedades físico-químicas parecidas com a maioria dos compostos analisados pelo LAB RES, além de não ser uma substância proibida no controle de dopagem equino. Ela possui uma fórmula molecular igual a $C_{10}H_{14}N_4O_2$ e uma massa monoisotópica de 222,11 g/mol. Ambas substâncias do método foram analisadas pelo espectrômetro de massas no modo positivo de ionização. A Figura 5 apresenta a fórmula estrutural da 7-propilteofilina.

Figura 5 – Fórmula estrutural da 7-propilteofilina (1,3-dimetil-7-propilpurina-2,6-diona).



Fonte: Autoria própria com utilização do ChemSketch (2019).

2.3.4) Testes para a validação de um método qualitativo

Os diversos testes realizados para a validação do método seguem critérios específicos, retirados dos documentos nacionais e internacionais citados anteriormente, e cada um com o seu respectivo significado, descritos a seguir.

- Seletividade: Capacidade de identificar um analito em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes da mistura.
- Limite de detecção (LD): É a concentração mínima de analito que pode ser detectada, obtendo uma razão sinal/ruído igual ou superior a 3.
- Interferência da matriz: Avaliação do quanto a matriz influencia no procedimento analítico durante a identificação do analito na amostra.
- Repetitividade: Medida do erro aleatório expressa pela dispersão obtida em uma série de medidas repetidas durante o mesmo experimento, considerando a razão entre as áreas do íon de maior intensidade para o analito e padrão interno.

- Capacidade de identificação: A capacidade de identificação do método é avaliada pela comparação entre a intensidade relativa obtida para os íons e da variação do tempo de retenção do analito.
- Rendimento de extração: Relação existente entre a resposta obtida quando se analisa uma quantidade definida de analito, presente em matriz biológica, e a resposta obtida quando se analisa a mesma quantidade de analito, sendo este adicionado à matriz após todas as etapas de extração.
- Arraste: Condição em que ocorre a contaminação de uma amostra negativa, por outra que contenha um analito de interesse, durante o processamento da amostra, ou durante a análise instrumental.
- Robustez: Medida de sensibilidade que o procedimento apresenta em face de pequenas variações nas condições de análise.

3) OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método de detecção do clenbuterol em amostras de urina e plasma de equinos, buscando atender os limites máximos de concentração permitidos pelas federações equinas internacionais. Para o desenvolvimento de um método de detecção de clenbuterol eficiente e seguro, de forma a garantir o resultado obtido, realizou-se:

- Otimização dos parâmetros instrumentais para uma maior intensidade do sinal de resposta das moléculas analisadas;
- Desenvolvimento do gradiente da cromatografia usando o padrão de clenbuterol e um padrão interno;
- Validação de um método de extração líquido-líquido em pH básico do clenbuterol em matriz de urina e plasma;
- Análise das amostras após extração em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas;
- Validação do método analítico através de testes como: seletividade, limite de detecção, interferência da matriz, repetitividade, capacidade de identificação, rendimento de extração, arraste e robustez.

4) MATERIAIS, REAGENTES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS

A seguir estão listados todos os materiais, reagentes, padrões e equipamentos utilizados no desenvolvimento do presente projeto.

Além disso, foram utilizadas amostras de urina e plasma de equinos, provenientes de clientes do LAB RES, onde foi detectada a ausência de qualquer substância proibida por métodos de análise já validados, para seu uso como branco de ambas matrizes. Para os ensaios onde era necessário o uso de 10 brancos de matriz de origens diferentes, foram escolhidas 10 amostras de cada entre os brancos disponíveis. No caso onde era utilizado o mesmo branco de matriz diversas vezes, foi preparada uma batelada de amostras diferentes das anteriores para se obter um maior volume final de uma mesma amostra. Todas as amostras eram estocadas em câmara fria e freezer, ambos a -20°C.

O uso desses brancos de urina e plasma de cavalos para pesquisa científica foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), situada no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ). O nome do projeto intitulado no documento é: “Estudo de detecção e estabilidade de fármacos com o uso potencial como agentes dopantes em equinos”, protocolo número 142/18, em nome do professor Francisco Radler de Aquino Neto, coordenador do LADETEC. O projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de substâncias provenientes de animais para fins de pesquisa científica. O projeto foi aprovado em reunião no dia 19/02/2019, com vigência até 21/03/2022. Essas e outras informações disponibilizadas no documento do ANEXO A.

4.1) Materiais

- Agitador magnético;
- Balança de precisão 0,00001 g;
- Bécheres de diversos tamanhos;
- Bomba de vácuo;
- Cartuchos C18 Applied Separation;
- Coluna cromatográfica C8 ZORBAX Eclipse Plus;
- Cronômetro;

- Cuba de extração;
- Dispensador automático;
- Espátulas de metal;
- Estantes para frasco *vial* e tubo de ensaio;
- Frascos âmbar de diversos tamanho para armazenamento das soluções;
- Frascos *vial* de 2 mL;
- *Inserts* com mola de 200 μ L de capacidade;
- Pipeta repetidora de volume variável;
- Pipetas automáticas de volume variável;
- Pipetas Pasteur de vidro de 5 mL;
- Ponteira de 2, 5 e 50 mL para pipeta repetidora;
- Ponteiras de 10, 100, 1000 μ L e 5 mL para pipeta automática;
- Tampas para frasco *vial*;
- Tampas de rosca para tubo de ensaio;
- Tubos de ensaio de rosca de 10 mL;
- Tubos *falcon* com filtro de 0,2 μ m;
- Tubos *safe-lock* Eppendorf de 1,5 mL.

4.2) Reagentes

- Acetato de etila – Tedia;
- Ácido acético – Tedia;
- Ácido fórmico – Merck;
- Ácido tricloroacético (TCA) – Sigma;
- Água ultrapura – Milli-Q;
- Bicarbonato de sódio – Merck;
- Carbonato de sódio – Merck;
- Enzima β -Glucuronidase de E. Coli – Roche;
- Éter metil-terc-butílico (TBME) – Tedia;
- Formiato de amônio – Tedia;
- Fosfato de sódio monobásico – Merck;

- Fosfato dissódico anidro – Merck;
- Metanol – Tedia.

4.3) Padrões

- 7-propilteofilina – Enamine Ltd.;
- Clenbuterol – LGC.

4.4) Equipamentos

- Agitador vórtex – Thermo Scientific;
- Banho-maria termostatzado – Quimis;
- Centrífuga – Thermo Scientific 3SR+;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Agilent 1260 Infinity;
- Espectrômetro de massas – Sciex QTRAP 5500;
- Evaporador – Biotage TurboVap LV;
- Purificador de água – Thermo Scientific Barnstead Pacific TII;
- Purificador de água – Thermo Scientific GenPure.

5) METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O LAB RES tem sua rotina dividida em três etapas principais: recepção de amostras de urina e sangue de equinos; triagem de agentes dopantes, utilizando técnicas de extração sólido-líquido (ESL) e análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM); e a confirmação de suspeitas oriundas da triagem, empregando extração líquido-líquido (ELL) em uma nova alíquota da mesma amostra e análise em sistema de CLAE-EM diferente do anterior. Essa última extração variando entre pH básico e pH ácido dependendo do pKa dos compostos que se deseja confirmar.

A Figura 6 apresenta um diagrama de blocos do procedimento padrão realizado no laboratório, incluindo suas principais etapas. O método desenvolvido nesse projeto é referente às últimas etapas do diagrama, a confirmação de uma substância proibida detectada na etapa da triagem.

Figura 6 – Diagrama de blocos do procedimento padrão realizado nas amostras analisadas.



Como pode ser observado nas propriedades físico-químicas do clenbuterol na Tabela 1, utilizou-se a extração em meio básico devido seu elevado valor de pKa. O procedimento de extração utilizado na rotina e as demais etapas realizadas para a validação do método estão descritos a seguir.

5.1) Procedimento de extração líquido-líquido em meio básico

Para a investigação por CLAE-EM da substância proibida na amostra, é necessário reunir um conjunto de controles positivos e negativos para servirem de referência ao resultado das análises. Todos os controles e a amostra devem passar pelo mesmo procedimento de extração líquido-líquido em meio básico em uma batelada, de modo que o mesmo procedimento seja utilizado em todos, evitando erros. O conjunto será composto por: BR; CQNC ou CQNP; AMOSTRA; CQPC ou CQPP.

- BR (branco): branco de reagente, com volume de 2 mL de água ultrapura no caso de extração com urina, ou 500 µL com plasma, fortificado com a 7-propilteofilina, o padrão interno selecionado.
- CQNC (controle negativo de urina): branco de urina, com volume de 2 mL da amostra de urina isenta de substâncias proibidas, fortificado com a 7-propilteofilina, o padrão interno selecionado.
- CQNP (controle negativo de plasma): branco de plasma, com volume de 500 µL da amostra de plasma isenta de substâncias proibidas, fortificado com a 7-propilteofilina, o padrão interno selecionado.
- CQPC (controle positivo de urina): branco de urina, com volume de 2 mL da amostra de urina isenta de substâncias proibidas, fortificado com a solução padrão da substância que se deseja confirmar, no caso, clenbuterol, e com a 7-propilteofilina, o padrão interno selecionado.
- CQPP (controle positivo de plasma): branco de plasma, com volume de 500 µL da amostra de plasma isenta de substâncias proibidas, fortificado com a solução padrão da substância que se deseja confirmar, no caso, clenbuterol, e com a 7-propilteofilina, o padrão interno selecionado.

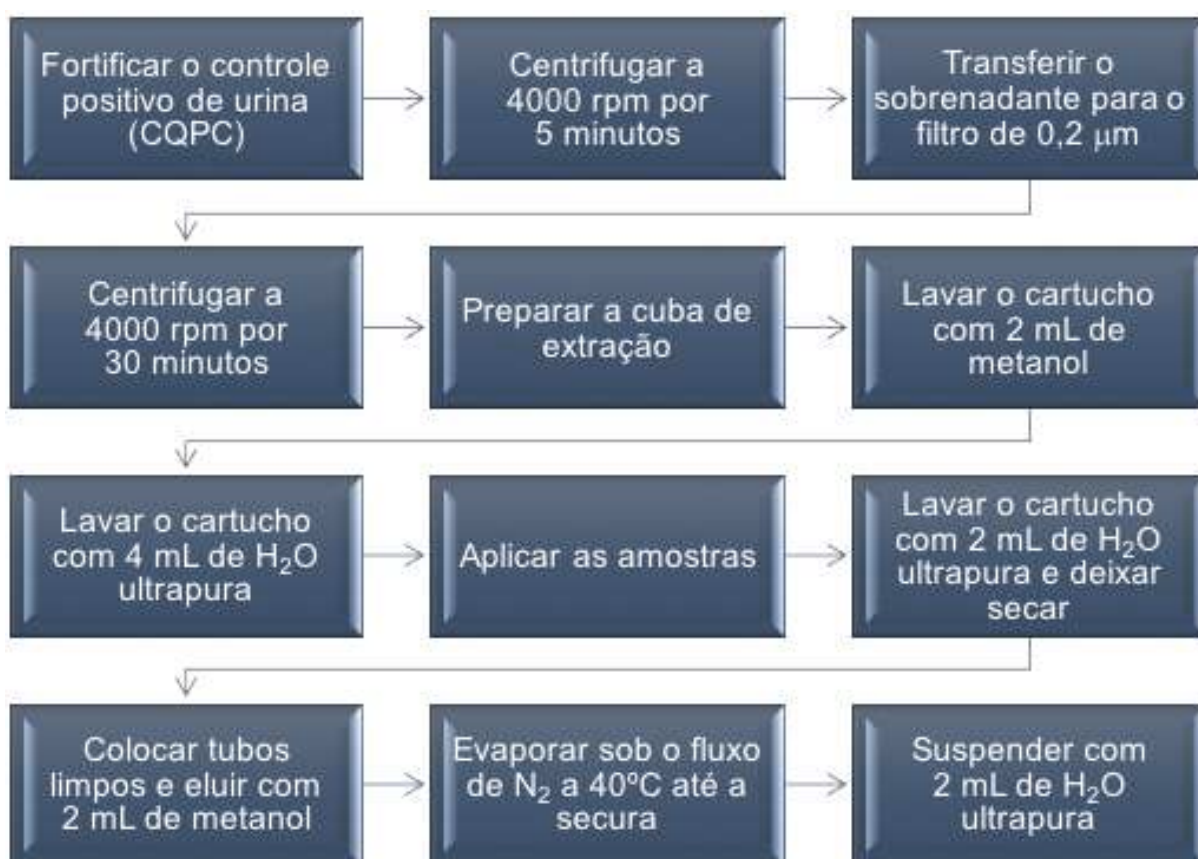
O número de alíquotas da amostra e do controle positivo podem variar dependendo da concentração suspeita. As amostras foram diluídas em diferentes proporções, de forma a evitar a saturação do sinal no detector do espectrômetro de massas, e os controles positivos fortificados de forma a obter uma concentração aproximada da amostra diluída. Essa estimativa da concentração da substância suspeita é levantada a partir dos resultados obtidos no laudo parcial da triagem.

5.1.1) Etapa de *Clean up* em urina de equinos

Devido à natureza da matriz analisada, proveniente de diversas espécies de cavalos por todo o Brasil, se torna necessária a utilização de uma etapa de limpeza somente para as amostras de urina, denominada *Clean up*. É necessário realizar a fortificação do controle positivo com o composto de interesse antes da etapa de *Clean up*, para que a substância fortificada passe pelos mesmos procedimentos da substância na amostra, e possam ser comparadas. Nesse caso, não há necessidade do BR passar por essa etapa, por ser o branco de reagente, sendo adicionado ao conjunto só no procedimento de extração.

A etapa denominada *Clean up* está representada no diagrama de blocos apresentado na Figura 7 e será detalhada a seguir.

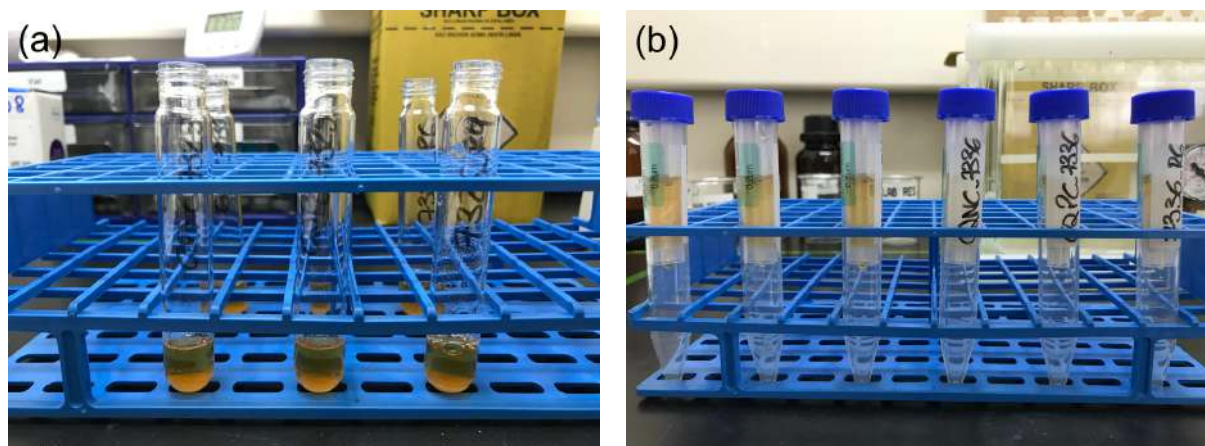
Figura 7 – Diagrama de blocos da etapa de *Clean up* em urina de equinos.



O primeiro passo da etapa de *Clean up* envolveu retirar os sólidos mais grosseiros das amostras de urina. Realizou-se uma centrifugação nos tubos por 5

minutos a 4000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um filtro de 0,2 μm , retirando sólidos de granulometria menores após uma outra centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm. A Figura 8 apresenta (a) tubos com amostras pré-*Clean up* e (b) tubos *falcon* com filtro de 0,2 μm .

Figura 8 – (a) Tubos com amostras pré-*Clean up* e (b) tubos *falcon* com filtro de 0,2 μm .



Preparou-se, então, uma cuba de extração contendo cartuchos com uma fase sólida C18, com o intuito de retirar impurezas polares por meio de uma lavagem com solventes. A fase sólida é composta por cadeias carbônicas de 18 átomos ligadas quimicamente a uma sílica, se tornando apolar.

Inicialmente, fez-se uma lavagem para ativação do cartucho com 2 mL de metanol, seguido de 4 mL de água ultrapura, com o cuidado para não deixar o cartucho secar, de modo a evitar que partículas da fase sólida fossem arrastadas com o vácuo que é aplicado nos cartuchos. As amostras foram transferidas dos tubos *falcon* com o filtro para o cartucho que, em seguida, foi lavado com mais 2 mL de água ultrapura até a secura do mesmo, retirando assim todo o solvente polar do cartucho, para posterior arraste das substâncias com o solvente apolar.

Colocou-se tubos limpos na cuba e transferiu-se 2 mL de metanol para o cartucho até a secura novamente, garantindo que toda a substância retida pelo cartucho seja recuperada. A solução final de metanol com a substância de interesse foi evaporada sob um fluxo de N_2 em um banho de 40°C e o resíduo foi suspenso com 2 mL de água ultrapura, retornando a uma polaridade similar a inicial, o que ajuda no procedimento posterior de extração líquido-líquido. Após uma agitação em agitador

de tubos do tipo vórtex, os tubos seguiram para as próximas etapas. A Figura 9 apresenta (a) cuba de extração e (b) tubos com amostras pós-*Clean up*.

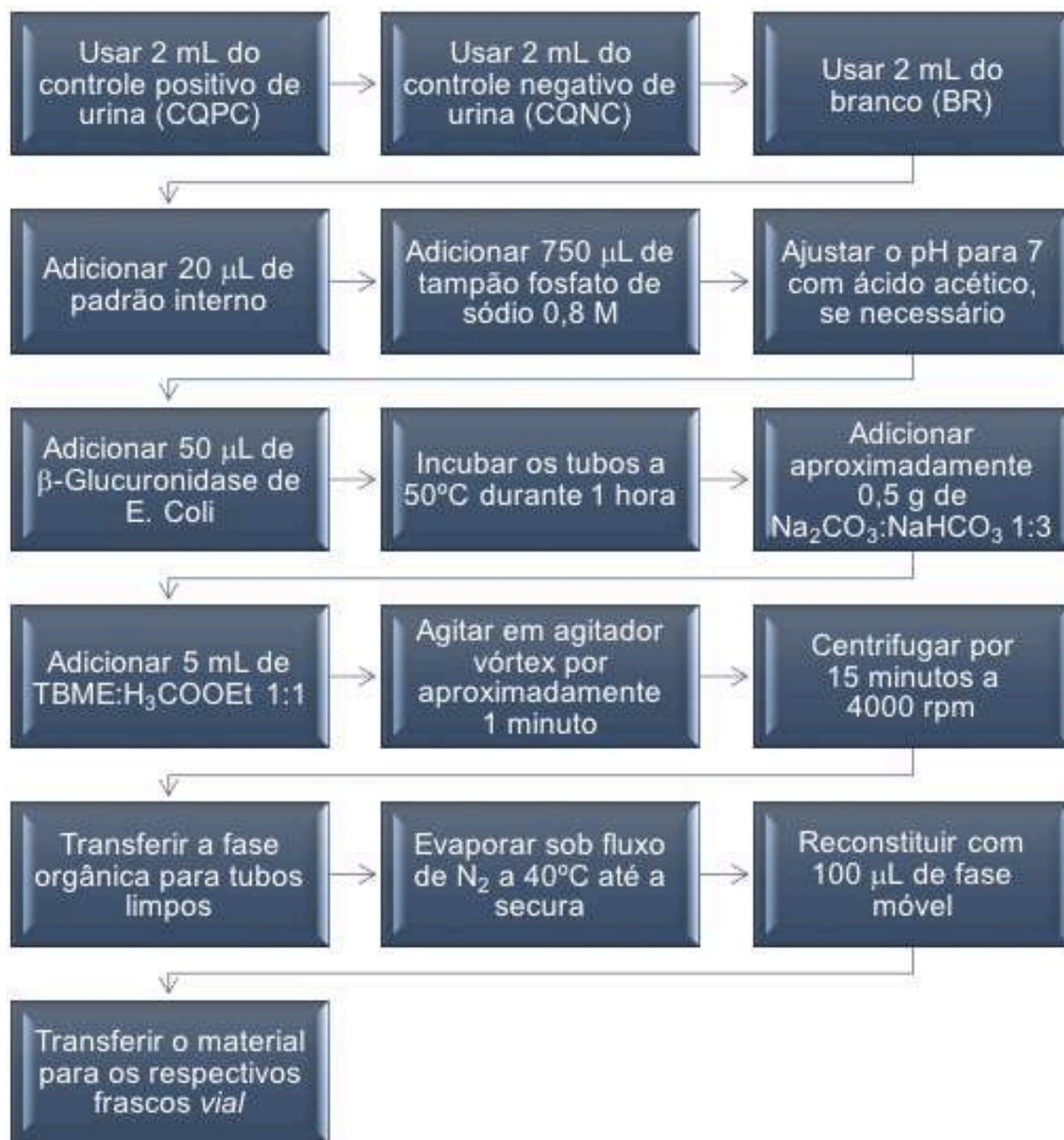
Figura 9 – (a) Cubo de extração e (b) tubos com amostras pós-*Clean up*.



5.1.2) Etapa de extração em urina de equinos

Após a realização do *Clean up*, as amostras seguiram para a etapa de extração líquido-líquido em meio básico. A Figura 10 apresenta o diagrama de blocos da extração líquido-líquido realizada nas amostras de urina de equinos.

Figura 10 – Diagrama de blocos da extração líquido-líquido em meio básico em urina de equinos.



Para a realização da extração líquido-líquido em amostras de urina, adicionou-se ao conjunto, proveniente da etapa de *Clean up*, uma alíquota de 2 mL de água ultrapura (BR). Adicionou-se 20 µL da 7-propilteofilina de concentração 2 µg/mL, o padrão interno selecionado, em todos os tubos para se obter uma concentração final de 20 ng/mL em solução.

Após essa etapa, iniciou-se o preparo para a hidrólise enzimática com duração de 1 hora a 50°C. Para tal, transferiu-se 750 µL de uma solução tampão de fosfato de

sódio 0,8 M, ajustando o pH para 7 com ácido acético, quando necessário. O pH 7 é o valor ótimo de funcionamento da enzima β -Glucuronidase de E. Coli, que foi adicionada aos tubos com um volume de 50 μ L. A hidrólise enzimática tem como objetivo quebrar as ligações covalentes entre o analito e moléculas às quais esteja conjugado. Possui como vantagem a não degradação do analito, porém possui como desvantagens um custo mais elevado, as enzimas podem ser inibidas por substâncias presentes na amostra e é recomendado o uso de controles, frente a hidrólise ácida ou alcalina.

Feito isso, elevou-se o pH das soluções com a adição de 0,5 g do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$ 1:3 para realização da extração em meio básico, em seguida, adicionou-se 5 mL do solvente orgânico que é uma mistura 1:1 de éter metil-terc-butílico (TBME) e acetato de etila (H_3COOEt). O sal realiza, também, o efeito de *salting out*, fazendo com que a solubilidade do composto na fase orgânica aumente. O tubo foi agitado em agitador vórtex por aproximadamente 1 minuto, com a ajuda de um cronômetro, e depois, centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm para ocorrer a separação das fases. A fase orgânica foi transferida para tubos limpos e evaporada sob fluxo de N_2 em um banho a 40°C.

Preparou-se uma fase móvel composta por 70% de água ultrapura e 30% de metanol, com adição de aditivos na concentração de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. Foram utilizados 100 μ L dessa solução para reconstituir o resíduo, que após uma agitação em agitador vórtex garante que todos os analitos foram solubilizados. A solução foi transferida para um *insert* com mola, devido ao baixo volume final, que se encontrava dentro de um frasco *vial* etiquetado de acordo com a respectiva amostra.

5.1.3) Etapa de extração em plasma de equinos

Como pode ser observado no diagrama de blocos da Figura 11, o procedimento de extração líquido-líquido em meio básico do plasma é muito parecido com o da urina. São utilizados volumes das amostras reduzidos e consequentemente um volume menor também dos reagentes utilizados.

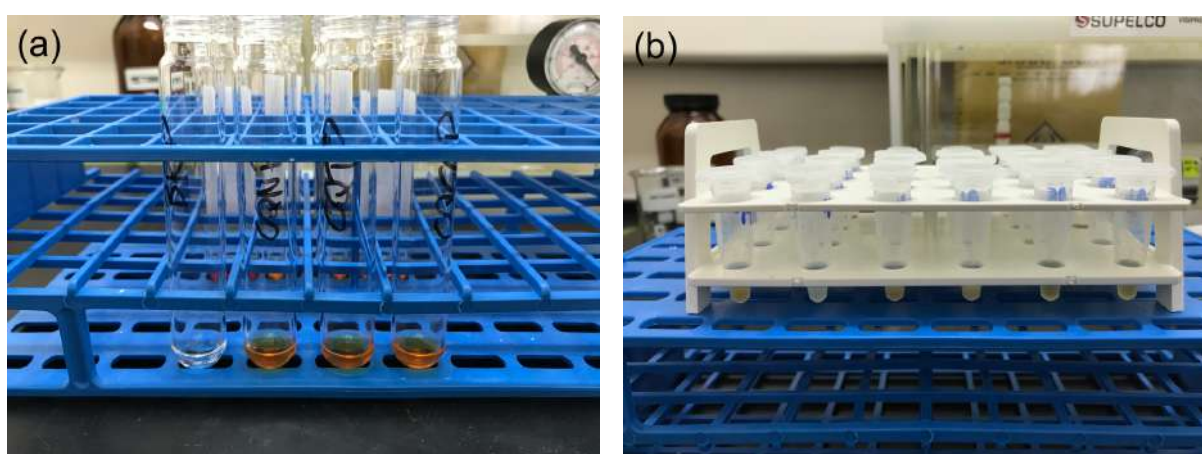
Figura 11 – Diagrama de blocos da extração líquido-líquido em meio básico em plasma de equinos.



A diferença consiste na etapa de adição de 50 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA) para precipitar as proteínas presentes no plasma, que em contato com a fase móvel poderiam vir a obstruir a coluna cromatográfica, seguido de uma centrifugação

por 10 minutos a 4000 rpm para separar esse precipitado. No final da extração, uma última centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm, utilizando um tubo *safe-lock* da marca Eppendorf, foi realizada para retirar qualquer resíduo sólido que pode ter restado do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$ 1:3 na fase orgânica, visto que com o volume reduzido, a transferência da fase orgânica para tubos limpos poderia carregar o sal em solução. A Figura 12 apresenta (a) tubos com amostras de plasma e (b) tubos *safe-lock* Eppendorf.

Figura 12 – (a) Tubos com amostras de plasma e (b) tubos *safe-lock* Eppendorf.



5.2) Validação do método qualitativo

Para a validação do método qualitativo, utilizaram-se conjuntos de controles, que passaram pelo mesmo procedimento de extração utilizado na rotina, descrito anteriormente, para a avaliação de diversos testes. Após a extração líquido-líquido, os conjuntos de controles foram analisados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Todas as etapas detalhadas a seguir.

5.2.1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Agilent 1260 Infinity, com uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C8 de especificações: diâmetro interno de 2,1 mm, comprimento de 100 mm e partículas com 3,5 μm de tamanho. Possui recomendações de uso com uma variação de pH entre 2 e 9, temperatura máxima de

60°C e uma pressão limite de 400 bar. O cromatógrafo possui uma bomba quaternária que inclui um desgaseificador e um mecanismo de pistão duplo em série.

As soluções utilizadas no cromatógrafo são divididas em dois grupos, A e B. Na posição frontal, A1 e B1, foram utilizados a água ultrapura e o metanol, respectivamente, com os mesmos aditivos da fase móvel, ou seja, contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. Nas posições traseiras, A2 e B2, foram utilizados os mesmos solventes, porém puros, para realizar a limpeza do sistema e da coluna sem deixar aditivos na linha. Uma quinta solução foi preparada para a lavagem da seringa de injeção, que utiliza um fluxo contínuo desse solvente durante um certo período de tempo. Nesse projeto foi utilizado como solução de limpeza uma mistura de 90% de metanol e 10% de água ultrapura.

Durante as análises cromatográficas, utilizou-se as soluções A1 e B1 para a formação do gradiente de solventes. Os aditivos são utilizados nessa etapa pois facilitam a ionização dos analitos em solução na fonte do espectrômetro de massas, fator fundamental para se obter uma boa intensidade e resposta do sinal.

A sequência de injeção das amostras e controles utilizados durante a rotina, para evitar qualquer tipo de interferência ou contaminação entre os frascos, foi: BR; CQNC ou CQNP; AMOSTRA; CQNC ou CQNP Reinjeção; CQPC ou CQPP; ANALITO em Fase móvel. Iniciou-se com os frascos que não tem o analito presente, seguido da amostra e dos controles positivos. Para ter uma confiabilidade maior no resultado obtido, injetou-se novamente o controle negativo entre a amostra e o controle positivo, para observar a ausência do pico e confirmar que o visto no controle positivo é o analito de interesse e não um arraste da amostra.

5.2.2) Espectrômetro de massas

Acoplado ao CLAE estava o espectrômetro de massas do modelo QTRAP 5500 da Sciex, sistema projetado para a análise qualitativa e quantitativa de espécies químicas. Para se obter um melhor funcionamento do equipamento, com melhores sinais de resposta das análises, foi necessária a realização de otimizações de seus parâmetros, descritos a seguir.

5.2.2.1) Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

Existem duas etapas de otimizações automáticas do clembuterol para o espectrômetro de massa. A primeira são os parâmetros dependentes do composto, onde se utiliza uma vazão de infusão da amostra para o espectrômetro de massas de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizando uma seringa de 1 mL. A segunda otimização são os parâmetros dependentes da fonte de ionização, nesse caso foi utilizada a FIA (*Flow Injection Analysis*), que é uma injeção da amostra pelo amostrador automático do cromatógrafo líquido, sem a utilização de uma coluna cromatográfica. Foi empregada uma vazão correspondente à usada na análise cromatográfica com coluna de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A posição da probe é variável dependendo do fluxo que está sendo inserido na fonte de ionização, para aumentar a sensibilidade da análise. Quanto maior for a distância da posição vertical, mais próxima a probe estará do orifício da *Curtain Plate*. Por isso, com baixos fluxos se utiliza valores altos na posição vertical e o inverso também é válido, uma vez que altos fluxos podem saturar o orifício, caso o spray esteja muito próximo do orifício. Assim, as posições da *TurbolonSpray Probe* utilizadas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Posição da *TurbolonSpray Probe* para diferentes vazões de operação.

Vazão de operação ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Posição vertical (mm)	Posição horizontal (mm)
10	10	5
500	2	5

5.2.2.1.1) Parâmetros dependentes do composto

As voltagens dos parâmetros são gradualmente aumentadas ou diminuídas para determinar a intensidade máxima do sinal do íon precursor e fragmentos. Dessa forma, o software realiza uma rampa dos valores de CE e seleciona os fragmentos mais intensos para o critério estabelecido. A fragmentação da molécula permite ter uma credibilidade maior no resultado, uma vez que cada molécula possui uma forma de fragmentar diferente da outra, gerando um conjunto de íons precursor e fragmentos

específicos para ela. Em uma amostra positiva, todos esses íons apresentarão uma resposta ao ser analisado pelo espectrômetro de massas.

Para garantir que nenhum fragmento importante para o método de análise não fosse visto na otimização, o critério definido selecionou os 6 fragmentos mais intensos. Foi excluído qualquer íon com uma diferença de 18 Da do precursor, visto que esse fragmento poderia ser uma perda de uma molécula de água que não produz bons resultados em termos de repetitividade, uma vez que essa perda pode ocorrer até na fonte de ionização. Além disso, foi definido um mínimo de 50 Da para os fragmentos escolhidos, já que fragmentos abaixo desse valor requerem uma energia de colisão muito elevada, tornando o método pouco reproduzível nos íons encontrados, e uma polaridade positiva para a ionização do precursor.

Além da rampa de CE para a escolha dos 6 fragmentos mais intensos das moléculas, o software realiza novas rampas do DP, CE e CXP, para selecionar os valores que geram a maior intensidade de sinal para cada fragmento. Os analitos foram diluídos para uma concentração de 10 ng/mL em fase móvel para facilitar a ionização dos mesmos, caso contrário, o excesso de soluto nas gotículas não seria totalmente carregado, e na evaporação do solvente, parte do analito seria perdido por não ser atraído pelo espectrômetro de massas.

5.2.2.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização

Os parâmetros da fonte de ionização são ajustados para uma análise cromatográfica e não para cada substância. Dessa forma, foram otimizados somente os parâmetros para o clenbuterol, para que sua sensibilidade fosse a máxima possível mesmo podendo prejudicar a intensidade observada de outras substâncias, como o padrão interno por exemplo. Foi utilizada a mesma solução de 10 ng/mL em fase móvel.

Durante o processo de otimização da FIA, várias injeções da amostra foram realizadas para vários tipos de parâmetros que são alterados entre as injeções. Somente um parâmetro é avaliado a cada injeção e os ensaios foram realizados em triplicata, ou seja, ocorreram 3 injeções para um mesmo valor de um parâmetro, depois passou-se para o próximo valor pré-definido, e assim sucessivamente. No final, é realizada uma média das intensidades das triplicatas e o software define como valor

ótimo aquele que obteve a maior intensidade para um dado fragmento. Após isso, é definido como o valor ótimo da molécula aquele em que a soma das médias de cada valor para todos os fragmentos dê a maior intensidade final.

Para se iniciar a otimização com a FIA é necessário utilizar o método gerado na otimização dos parâmetros dependentes do composto. Ele possui o nome *Clenbuterol_QOpt_FinalMRM_Pos.dam*, já contendo os fragmentos selecionados, DP, CE e CXP, respectivos. É necessário realizar algumas modificações no método para a realização da FIA. Foi definido o tempo total de corrida como 0,7 minutos e os seguintes valores iniciais dos parâmetros que serão otimizados, para o equilíbrio do sistema antes das injeções: CUR – 20 psi; IS – 5000 V; TEM – 550°C; GS1 – 45 psi; GS2 – 45 psi; CAD – *Medium*.

Na Tabela 4, encontram-se todos os parâmetros otimizados da fonte de ionização para o clenbuterol e os valores que foram analisados a cada injeção.

Tabela 4 – Parâmetros da fonte de ionização otimizados pela FIA.

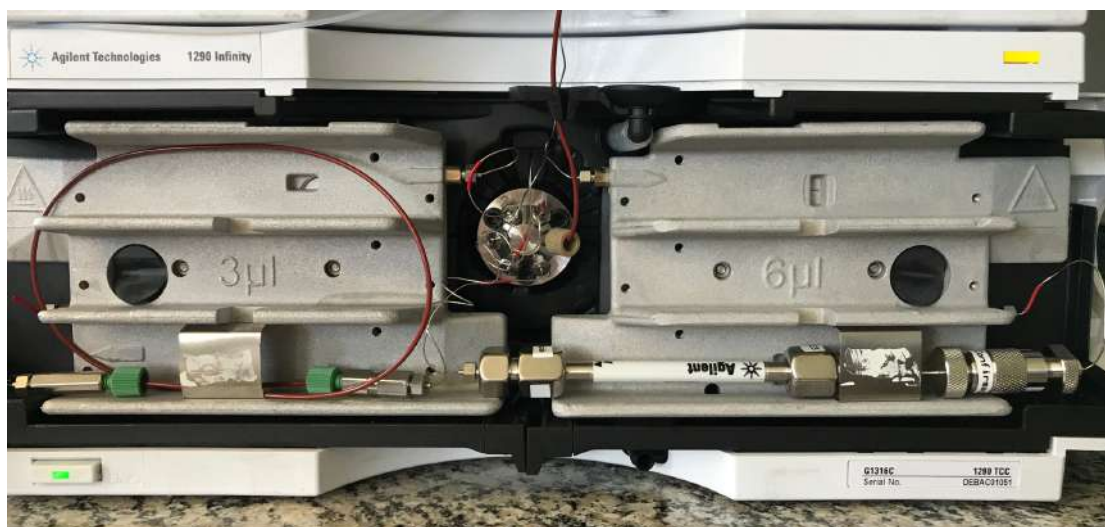
Parâmetros	Valores para otimização
CUR (<i>Curtain Gas</i>)	20; 22; 25; 30 psi
IS (<i>IonSpray Voltage</i>)	3500; 4000; 4500; 5000; 5500 V
TEM (<i>Temperature</i>)	450; 500; 550; 600; 650; 700°C
GS1 (<i>Ion Source Gas 1</i>)	40; 45; 50 psi
GS2 (<i>Ion Source Gas 2</i>)	40; 45; 50 psi
CAD (<i>Collisionally Activated Dissociation Gas</i>)	<i>Low; Medium; High</i>

Foi definido também um gradiente para os 0,7 minutos de corrida, a 500 µL/min de vazão, de 50% de água ultrapura e 50% de metanol com os aditivos durante todo o tempo. O volume de injeção foi de 20 µL e o nível da seringa -3 mm, garantindo que tenha volume suficiente no frasco para toda a otimização, uma vez que a FIA utiliza quase o volume de um frasco *vial* cheio. Foi ativada uma lavagem da seringa com a solução de limpeza por 5 segundos e uma refrigeração do amostrador automático a 4°C, evitando a degradação das substâncias.

Manteve-se a temperatura do forno em 20°C, já que não era necessário aquecer por não estar sendo utilizada a coluna cromatográfica, e foi direcionado o fluxo para a tubulação de plástico por onde ocorreu a otimização. O esquema da

coluna cromatográfica e a tubulação de plástico instalados no CLAE podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – Posição da tubulação de plástico para otimização e da coluna cromatográfica no CLAE.



5.2.3) Desenvolvimento do gradiente da análise cromatográfica

Para o desenvolvimento do gradiente da cromatografia líquida, foi construído um método de aquisição com todos os fragmentos e parâmetros obtidos nas otimizações do clenbuterol e 7-propilteofilina. Foi desenvolvido um gradiente com 40% de metanol com aditivos no início da análise até 70% no final, com uma duração total de 14 minutos, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Gradiente da análise cromatográfica de 14 minutos.

Tempo (min)	Vazão ($\mu\text{L}/\text{min}$)	A1 (%)	B1 (%)
0,00	500	60	40
1,00	500	60	40
10,00	500	30	70
11,00	500	30	70
11,01	500	60	40
14,00	500	60	40

Foi mantida a proporção de 40% de metanol por 1 minuto, para que o sistema pudesse equilibrar com a nova injeção realizada. Após isso, a proporção de B1 é aumentada gradualmente até 70% durante 9 minutos, onde permanece nesse valor durante 1 minuto para garantir que todos os íons foram retirados da coluna. Por fim, é retornado para a proporção inicial instantaneamente, mantendo esse valor por 3 minutos de modo a preparar o sistema para a nova injeção.

Como os resultados obtidos não foram satisfatórios, foi construído um novo método de aquisição com uma análise cromatográfica de 11 minutos, partindo de um gradiente inicial de 30% até 50% de metanol com aditivos. Utilizou-se a mesma metodologia da análise cromatográfica anterior para a construção dessa, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Gradiente da análise cromatográfica de 11 minutos.

Tempo (min)	Vazão (μL/min)	A1 (%)	B1 (%)
0,00	500	70	30
1,00	500	70	30
7,00	500	50	50
8,00	500	50	50
8,01	500	70	30
11,00	500	70	30

5.2.4) Construção do método final de aquisição de dados

Para construção do método, foram escolhidos somente os três fragmentos mais intensos do clenbuterol obtidos, 203,0, 131,9 e 167,9 Da, e para a 7-propilteofilina somente o mais intenso, 181,0 Da. No +EPI, foi definido como precursor o clenbuterol com m/z de 276,997 Da e uma faixa de varredura de 50 a 288,437 Da para cobrir a faixa de todos possíveis fragmentos, valores gerados pelo software. Os restantes dos parâmetros foram mantidos da otimização e o gradiente desenvolvido previamente.

Além do método de análise, foi construído um método de condicionamento da coluna, que consiste no equilíbrio da proporção inicial do gradiente na coluna cromatográfica, assim como, o equilíbrio dos parâmetros da fonte. Para o término das análises, foi construído um método de limpeza, ele possui um gradiente inverso até

uma concentração de 100% de metanol puro. De forma a evitar a precipitação de substâncias que ainda possam estar dentro da coluna, além de remover também os aditivos da fase móvel, aumentando sua vida útil.

5.2.5) Testes para a validação do método qualitativo

Os diversos testes realizados para a validação do método foram compostos de grupos de controles, que passaram pela extração líquido-líquido seguido da análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os detalhes de cada um deles estão descritos a seguir.

5.2.5.1) Seletividade

Foram analisados 10 brancos da matriz biológica de origens diferentes, que já tenham sido negativados, ou seja, amostras que deram resultado negativo para todas as substâncias controladas pelo laboratório. Foram observados no modo de varredura MRM, usando a polaridade positiva de ionização (+MRM), os fragmentos 203,0, 131,9 e 167,9 Da do clenbuterol, assim como o fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina, para a avaliação se havia algum interferente nos seus tempos de retenção. Durante o desenvolvimento da cromatografia, os tempos de retenção observados para o clenbuterol e a 7-propilteofilina foram de 1,95 e 3,67 minutos, respectivamente.

5.2.5.2) Limite de detecção

Foram analisados, em um primeiro momento, brancos fortificados em diferentes concentrações em duplicata, buscando a menor concentração que gere uma razão sinal/ruído aceitável. Em um segundo momento, 10 brancos de origens diferentes foram fortificados na concentração escolhida e foi confirmado o LD pela razão sinal/ruído igual ou superior a 3 de todas elas.

Foram definidas concentrações para o teste do limite de detecção de acordo com o ISL que instituições fiscalizadoras de *doping* em equinos predefiniram, sendo 0,1 ng/mL em urina e qualquer nível de detecção para o plasma. Os valores escolhidos para ambas as matrizes foram de 0,50, 0,20, 0,10 e 0,05 ng/mL.

Utilizou-se uma ferramenta do software Analyst, chamada *S-To-N-Script*, para o cálculo da relação sinal/ruído através de duas áreas marcadas no cromatograma. Em cada área, o software seleciona o pico de maior altura e realiza uma proporção entre esses valores, o sinal/ruído. Foram selecionadas as áreas onde o pico do clembuterol aparecia e uma região pequena adjacente a essa, tentando buscar o local com o maior ruído possível para ganhar confiabilidade nos resultados. Esse cálculo foi realizado para todos os fragmentos analisados, em cada uma das duplicatas de todas as concentrações, em ambas as matrizes de urina e plasma.

Para a confirmação do LD, foram realizadas fortificações nas mesmas amostras utilizadas no teste da seletividade. Foram utilizadas as concentrações atribuídas na etapa anterior, sendo a concentração do plasma menor do que o testado por obter bons resultados, sendo possível ser diminuída para a confirmação do LD. Foi verificado novamente se todas possuíam uma relação de sinal/ruído maior que 3.

Após essas etapas, foi possível dar prosseguimento com os outros testes para a validação do método. Foram realizadas as fortificações, para os próximos testes, nas concentrações de 0,20 ng/mL para a urina e 0,025 ng/mL para o plasma.

5.2.5.3) Interferência da matriz

Para esse teste foram reaproveitados os 10 brancos utilizados na confirmação do LD, que já estavam na concentração desejada. Esse teste avalia dois pontos principais, uma verificação da presença da substância fortificada e o coeficiente de variação percentual do tempo de retenção no fragmento mais intenso do clembuterol, 203,0 Da. Esse cálculo é realizado com o desvio-padrão dos resultados obtidos dividido pela média dos mesmos, de acordo com a Equação 1.

$$CV\% = \frac{s}{y_m} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

- CV%: coeficiente de variação percentual.
- s: desvio-padrão dos resultados obtidos no experimento.
- y_m : média dos resultados obtidos no experimento.

5.2.5.4) Repetitividade

Foram utilizados 7 brancos de um mesmo pool das duas matrizes, fortificados com o clenbuterol na concentração do LD e o padrão interno a 20 ng/mL. Com auxílio de uma ferramenta do software Analyst, calculou-se as áreas dos picos cromatográficos, e com elas, foi realizada uma razão da área do analito com a área do padrão interno, utilizando o fragmento mais intenso, 203,0 Da. A repetitividade foi avaliada pela dispersão dos resultados, além disso, foi avaliado, também, os valores aberrantes com o teste de Grubbs, para um nível de significância p de 0,025.

A dispersão dos resultados obtidos foi calculada pelo desvio-padrão relativo percentual, de acordo com a Equação 2.

$$RSD\% = \frac{s_r}{y_{m,r}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

- $RSD\%$: desvio-padrão relativo percentual (*relative standard deviation*).
- s_r : desvio-padrão das razões das áreas do analito e padrão interno.
- $y_{m,r}$: média das razões das áreas do analito e padrão interno.

O teste de Grubbs relaciona os valores máximos e mínimos observados nas razões das áreas, com a média e o desvio padrão. O valor de G foi calculado por meio das Equações 3 e 4.

$$G_{Inferior} = \frac{(y_{m,r} - y_{Min})}{s_r} \quad (\text{Equação 3})$$

$$G_{Superior} = \frac{(y_{Máx} - y_{m,r})}{s_r} \quad (\text{Equação 4})$$

Para o teste de Grubbs ser positivo, o valor de G calculado precisa ser menor do que um valor de G tabelado. Esses valores tabelados relacionam o número de amostras (n) que estão sendo analisadas e o nível de significância p , encontrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores tabelados do teste de Grubbs para $p = 0,025$ e n amostras.

n	Valor de G tabelado
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020

5.2.5.5) Capacidade de identificação

Para o teste da capacidade de identificação, foram reaproveitadas as 7 amostras do teste de repetitividade na análise dos resultados. Realizou-se o cálculo da intensidade relativa entre os íons. A intensidade relativa entre íons é uma razão entre o fragmento mais abundante e o fragmento em questão.

Foram definidas janelas de tolerância máxima para a intensidade relativa entre íons e o tempo de retenção dos fragmentos, utilizando a média dos valores como base. Para o tempo de retenção é utilizado aquele valor que dê o maior resultado no cálculo. Dessa forma, garante-se uma confiança apropriada na identificação do analito. As janelas de tolerância podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Janelas de tolerância máxima para intensidade relativa entre íons e tempo de retenção.

Intensidade relativa entre íons		Tempo de retenção
50% a 100%	± 10 (absoluta)	1% ou 0,1 min
25% a 50%	$\pm 20\%$ (relativa)	
1% a 25%	± 5 (absoluta)	

5.2.5.6) Rendimento de extração

Para o cálculo do rendimento de extração, foi utilizada uma metodologia parecida com a apresentada no teste de repetitividade. A diferença está na etapa de fortificação do analito e padrão interno nos 7 brancos de uma mesma fonte analisados, sendo fortificados na última etapa de extração, antes da fase orgânica ser evaporada

para reconstituição. Foi calculada a razão entre a área do analito e do padrão interno e verificou-se a presença de valores aberrantes pelo teste de Grubbs. Utilizou-se a razão das áreas do analito e padrão interno obtidas no teste de repetitividade para o cálculo do rendimento.

O rendimento foi obtido dividindo a razão de cada amostra no teste de repetitividade pela média das razões encontradas no teste do rendimento de extração, seguindo a Equação 5. O valor final do rendimento de extração será encontrado pela média do rendimento de cada amostra.

$$RE\% = \frac{y_{r,REP}}{y_{m,r,REN}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo:

- $RE\%$: rendimento de extração percentual.
- $y_{r,REP}$: razão da área do analito e padrão interno no teste de repetitividade.
- $y_{m,r,REN}$: média das razões das áreas do analito e padrão interno no teste do rendimento.

5.2.5.7) Arraste

Para o teste do arraste, foi realizada uma injeção de um branco de matriz, seguido de um branco fortificado com o analito acima das concentrações usualmente encontradas. Nesse teste foi realizada uma fortificação na concentração de 1,0 µg/mL de clenbuterol. Após o branco fortificado, foi realizada uma reinjeção do branco de matriz, para observar se ocorreria um aumento na área do cromatograma no tempo de retenção esperado para o clenbuterol.

Foi definido como critério do arraste pelo LAB RES: caso a área da reinjeção do branco seja até 3 vezes maior do que a área da primeira injeção, não ocorre arraste; caso a área seja maior do que 3 vezes, não é considerado arraste, se 50 vezes a área da reinjeção do branco, for menor do que a área do branco fortificado a 1,0 µg/mL; caso contrário, se 50 vezes o valor da área for maior, é considerado arraste.

5.2.5.8) Robustez

Para o teste de robustez, foram realizadas extrações com 7 brancos de uma mesma fonte, fortificados na concentração do LD, e foram realizadas pequenas alterações no procedimento de extração, escolhidas de forma a não modificar os pontos críticos do procedimento. Formaram-se dois grupos com mudanças distintas, para garantir a robustez do processo em vários aspectos, mudando somente a quantidade de reagentes utilizados para urina e plasma em cada, respectivamente. Os valores entre parênteses são as quantidades originais de cada experimento, observados na Tabela 9.

Tabela 9 – Alterações no procedimento de extração para o teste de robustez nas amostras de urina e plasma.

	Variável	Urina	Plasma
Grupo 01	Mistura de extração (TBME:H ₃ COOEt 1:1)	4 mL (5 mL)	1 mL (1,5 mL)
	Centrifugação para separação das fases	10 min (15 min)	5 min (10 min)
	Evaporação à 40°C	+ 15 min após secura	
Grupo 02	Enzima β-Glucuronidase	40 μL (50 μL)	20 μL (25 μL)
	Tempo de hidrólise	90 min (60 min)	
	Evaporação à 50°C	Até secura	

Para avaliação do método frente a sua robustez, foi verificado se o CV% da razão das áreas do analito e do padrão interno, para o fragmento mais intenso do clenbuterol, continuava abaixo de 20%. Alternativamente, utilizou-se a equação proposta por Horwitz, relacionando o CV% com a concentração do analito. Ou seja, se o valor encontrado experimentalmente for maior do que o calculado, essas alterações no procedimento não são recomendadas. A fórmula para o cálculo teórico se encontra na Equação 6.

$$CV\% = 2 \times C^{-0,15} \quad (\text{Equação 6})$$

6) RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1) Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

6.1.1) Parâmetros dependentes do composto

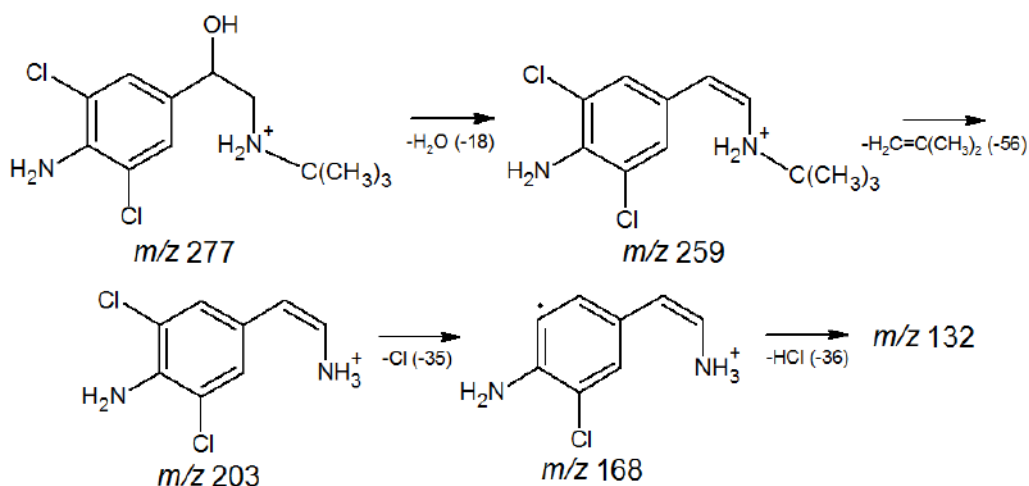
Os resultados obtidos nessa etapa de otimização dos parâmetros para análise do clenbuterol estão apresentados na Tabela 10. Uma possível rota de fragmentação está representada na Figura 14, podendo ser confirmado alguns dos fragmentos obtidos na otimização.

Tabela 10 – Otimização dos parâmetros dependentes do clenbuterol.

Precursor (Da)	Fragmentos (Da)	Intensidade (cps)	DP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
277,0	203,0	357260	76,0	23,0	10,0
277,0	131,9	115920	76,0	41,0	8,0
277,0	167,9	103910	76,0	41,0	10,0
277,0	139,8	43490	76,0	67,0	10,0
277,0	131,4	37560	76,0	37,0	8,0
277,0	103,9	25560	76,0	83,0	12,0

cps: contagem por segundo; DP: *Declustering Potential*; CE: *Collision Energy*; CXP: *Collision Cell Exit Potential*.

Figura 14 – Possível rota de fragmentação do clenbuterol.



Fonte: Adaptado de Guan et al. (2002) com utilização do ChemSketch (2019).

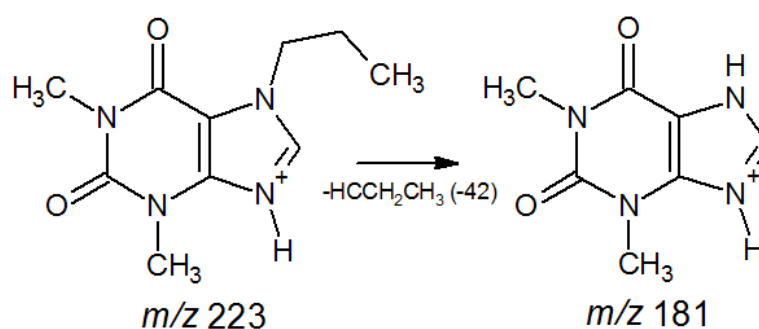
O mesmo procedimento foi realizado para o padrão interno, a 7-propilteofilina, obtendo os resultados apresentados na Tabela 11 e uma possível rota de fragmentação observada na Figura 15, confirmando o fragmento mais intenso encontrado.

Tabela 11 – Otimização dos parâmetros dependentes da 7-propilteofilina.

Precursor (Da)	Fragmentos (Da)	Intensidade (cps)	DP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
223,0	181,0	361930	96,0	23,0	10,0
223,0	124,0	196620	96,0	35,0	8,0
223,0	95,9	45220	96,0	41,0	8,0
223,0	69,0	33660	96,0	47,0	8,0
223,0	148,9	15380	96,0	29,0	8,0
223,0	93,9	10930	96,0	47,0	8,0

cps: contagem por segundo; DP: *Declustering Potential*; CE: *Collision Energy*; CXP: *Collision Cell Exit Potential*.

Figura 15 – Possível rota de fragmentação da 7-propilteofilina.



Fonte: Autoria própria com utilização do ChemSketch (2019).

6.1.2) Parâmetros dependentes da fonte de ionização

Ao finalizar todas as injeções para a otimização, o software criou um novo método de análise, com o nome *Clenbuterol_FIA_FIASample_1.dam*. Ele contém os resultados obtidos na FIA, além dos resultados já obtidos para cada fragmento na otimização anterior, que estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Otimização dos parâmetros dependentes da fonte de ionização.

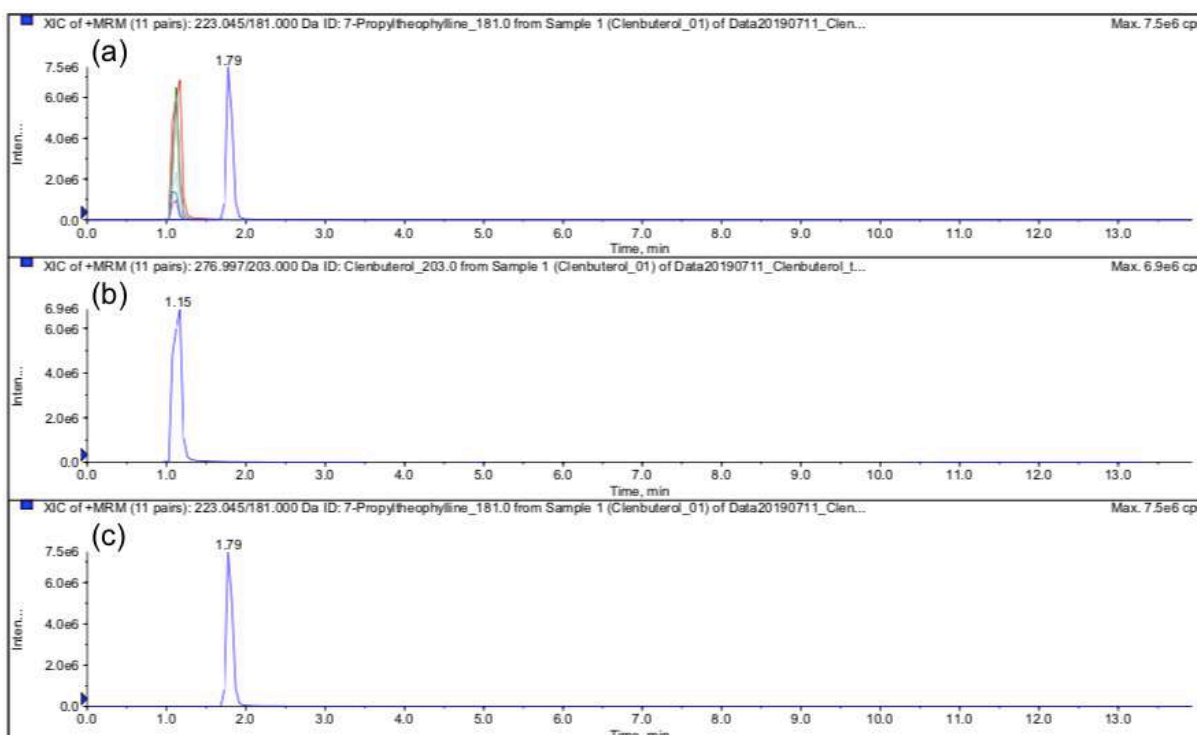
Parâmetro	Valor ótimo
CUR	20 psi
IS	3500 V
TEM	500°C
GS1	50 psi
GS2	45 psi
CAD	Medium

CUR: *Curtain Gas*; IS: *Ion Spray Voltage*; TEM: *Temperature*; GS1: *Ion Source Gas 1*; GS2: *Ion Source Gas 2*; CAD: *Collisionally Activated Dissociation Gas*.

6.2) Desenvolvimento do gradiente da análise cromatográfica

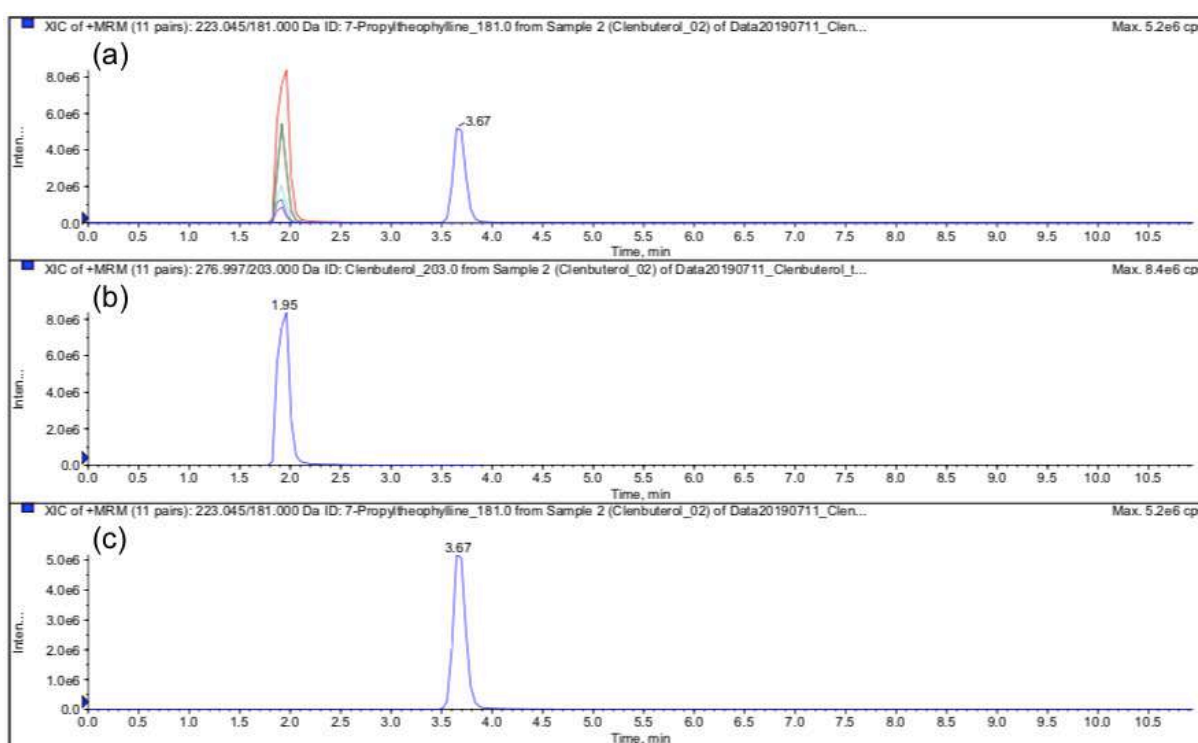
O gradiente inicial de 14 minutos da análise cromatográfica, iniciando com 40% de metanol até 70%, obteve o seguinte resultado representado nos cromatogramas da Figura 16.

Figura 16 – Cromatogramas da análise cromatográfica com duração de 14 minutos: (a) fragmentos do clenbuterol e o fragmento mais intenso da 7-propilteofilina; (b) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (c) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina.



Foi observado com esse experimento, que a proporção de 40% de metanol inicial era muito alta e os analitos estavam todos eluindo no início da análise cromatográfica. O clenbuterol foi eluído em 1,15 minutos e a 7-propilteofilina em 1,79 minutos. Por esse motivo, foi reduzida a proporção inicial de metanol para 30%, até somente 50%, visto que depois desse valor já não era eluída nenhuma outra substância. O resultado obtido com a nova análise está apresentado nos cromatogramas da Figura 17.

Figura 17 – Cromatogramas da análise cromatográfica com duração de 11 minutos: (a) fragmentos do clenbuterol e o fragmento mais intenso da 7-propilteofilina; (b) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (c) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina.



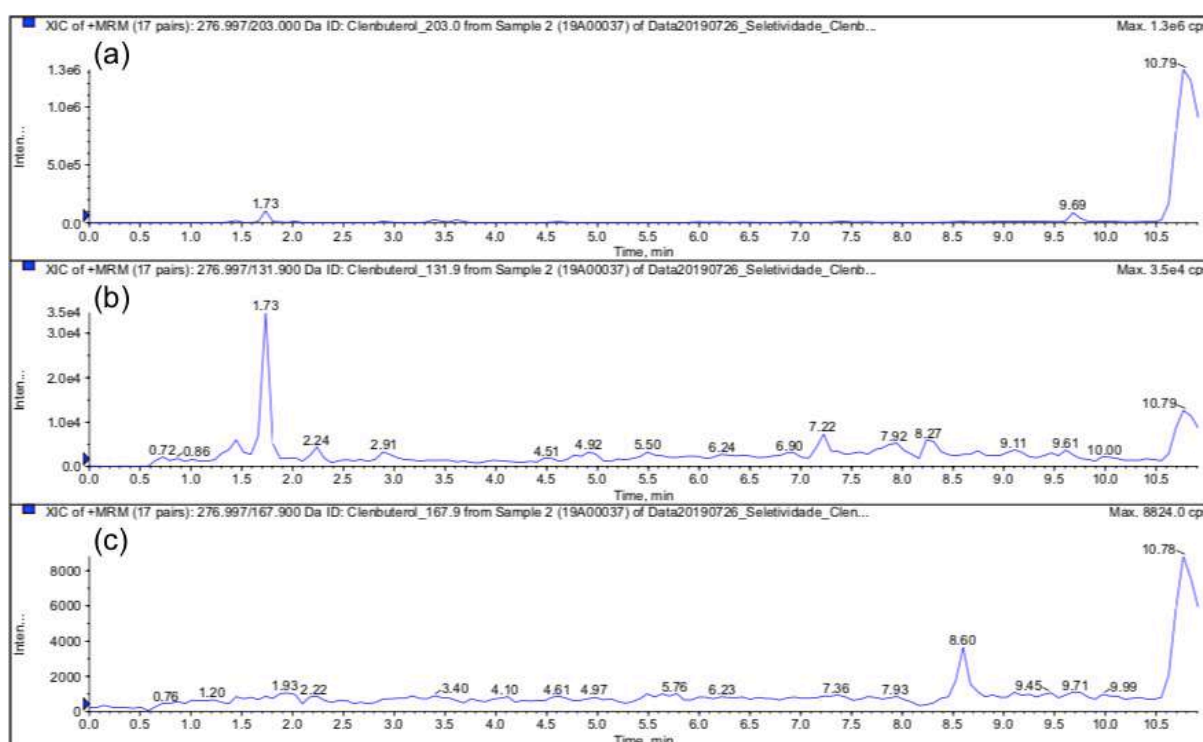
Como pode ser observado, o tempo de retenção do clenbuterol foi definido em 1,95 minutos e da 7-propilteofilina em 3,67 minutos. O resultado dessa análise foi satisfatório para o momento e pôde-se iniciar os testes para a validação do método qualitativo, descritos a seguir.

6.3) Testes para a validação do método qualitativo

6.3.1) Seletividade

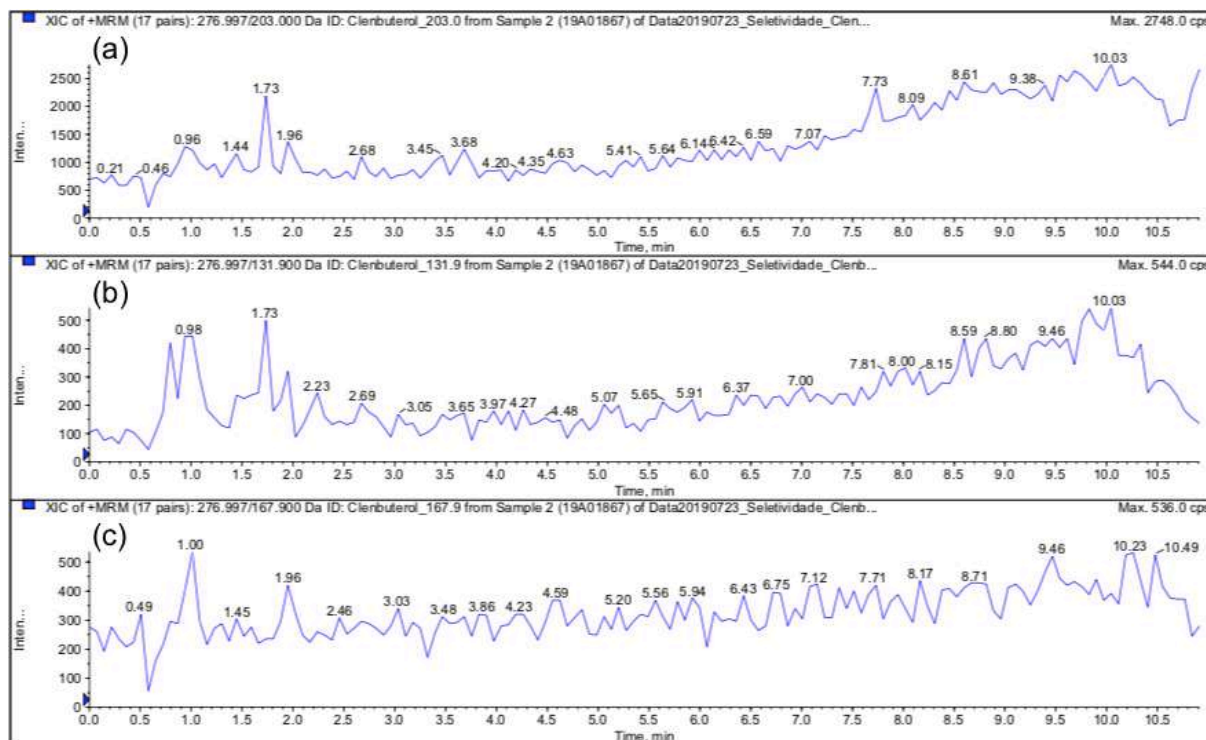
As Figuras 18 e 19 mostram os cromatogramas do Branco 01 para as matrizes de urina e plasma, respectivamente, sem a presença de nenhum pico no tempo de retenção esperado. Esse fato é visto em todos os demais brancos analisados, disponibilizados no APÊNDICE A.

Figura 18 – Teste da seletividade para a matriz de urina, Branco 01: (a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.



Com esses resultados foi possível concluir que, no tempo de retenção esperado para o clenbuterol, 1,95 minutos, não existe nenhum interferente que possa coeluir e gerar um falso positivo para a análise. Além disso, nota-se claramente com esse teste que a matriz de plasma possui um ruído muito inferior à matriz de urina de equinos, observado pelo valor da intensidade do sinal.

Figura 19 – Teste da seletividade para a matriz de plasma, Branco 01: (a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.



6.3.2) Limite de detecção

Os valores da relação sinal/ruído de cada fragmento em duplicatas e em cada concentração testada, estão representados na Tabela 13 e os cromatogramas referentes a essa etapa da validação no APÊNDICE B.

Pode ser observado na Tabela 8, que o ISL do clenbuterol em urina de equinos não foi alcançado com as técnicas de extração e instrumentais utilizadas. O fragmento 131,9 Da apresentou uma relação sinal/ruído abaixo de 3 em 0,10 ng/mL, e na concentração de 0,05 ng/mL, não apresentou pico devido ao elevado ruído no cromatograma. Porém, para a realidade do laboratório, foi possível validar o método na concentração de 0,20 ng/mL, uma vez que essa é muito próxima do ISL e já detecta o clenbuterol em praticamente todas as amostras positivas. Foi registrado como uma oportunidade de melhoria futura, a utilização de outras técnicas, tanto instrumentais como de extração, para atender aos limites da IFHA de 0,10 ng/mL para urina.

Em contrapartida, o plasma, por ser uma matriz muito menos complexa que a urina, apresentou valores altos da relação sinal/ruído para a menor concentração

testada de 0,05 ng/mL. Por esse motivo, foi decidido reduzir sua concentração limite, para a próxima etapa de confirmação do LD, para 0,025 ng/mL.

Tabela 13 – Relação sinal/ruído para o teste do limite de detecção nas amostras de urina e plasma.

Amostra		Fragmentos (Da)	0,50 ng/mL	0,20 ng/mL	0,10 ng/mL	0,05 ng/mL
Urina	1 ^a	203,0	31,4	15,9	15,3	27,6
		131,9	11,1	3,1	1,4	-
		167,9	22,5	6,2	4,4	3,3
	2 ^a	203,0	37,7	16,5	16,3	10,5
		131,9	6,8	3,1	1,0	-
		167,9	10,1	4,9	3,3	4,9
Plasma	1 ^a	203,0	481,3	334,7	254,1	155,8
		131,9	386,7	157,3	176,9	115,6
		167,9	341,2	208,7	98,9	55,5
	2 ^a	203,0	436,1	323,8	287,5	106,5
		131,9	370,5	262,2	148,1	49,1
		167,9	451,1	106,8	96,0	96,6

Os resultados obtidos na confirmação do LD da relação sinal/ruído de cada fragmento, dos 10 brancos de origem diferentes analisados, estão apresentados na Tabela 14. Da mesma forma da etapa anterior, os cromatogramas do experimento estão disponibilizados no APÊNDICE C.

Observou-se que, para a matriz de urina, a concentração de 0,20 ng/mL possuiu uma relação sinal/ruído superior a 3 para quase todos os fragmentos. Somente o fragmento 131,9 Da do Branco 08 apresentou uma relação de 2,4, porém por estar próximo do desejado e ser uma matriz muito complexa, em que o ruído varia muito de uma amostra para a outra, foi decidido dar continuidade na validação com esses dados obtidos.

Para a matriz de plasma, observou-se que mesmo reduzindo a concentração pela metade para a confirmação do LD, os fragmentos de todos os brancos obtiveram

bons resultados para a relação sinal/ruído, sendo o valor mais baixo de 13,1 do fragmento 167,9 Da do Branco 10.

Tabela 14 – Relação sinal/ruído para a confirmação do limite de detecção nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina (0,20 ng/mL)			Plasma (0,025 ng/mL)		
Fragmentos (Da)	203,0	131,9	167,9	203,0	131,9	167,9
Branco 01	6,5	4,7	41	27,9	27,4	23,2
Branco 02	9,8	8,1	32,1	53,1	40,1	26,1
Branco 03	5,6	9,5	37,3	30,4	27,1	16,9
Branco 04	31,8	23,2	67,8	35,9	36,0	29,2
Branco 05	7,0	12,1	8,8	37,1	39,4	26,5
Branco 06	33,4	3,7	18,9	57,5	44,9	19,9
Branco 07	3,1	7,9	10,2	60,9	25,9	38,9
Branco 08	13,6	2,4	22,6	15,9	29,8	18,5
Branco 09	6,8	3,4	25,3	39,8	39,6	23,9
Branco 10	3,7	5,8	36,6	32,9	27,3	13,1

6.3.3) Interferência da matriz

Para a avaliação dos resultados no teste da interferência da matriz, foram utilizados os mesmos cromatogramas da confirmação do LD, que já estavam na concentração desejada, presentes no APÊNDICE C, e o tempo de retenção do fragmento 203,0 Da do clenbuterol, disponibilizados na Tabela 15.

Era desejado que o pico cromatográfico estivesse presente em pelo menos 90% dos brancos analisados e que o coeficiente de variação para o tempo de retenção fosse inferior a 2%. Observando os mesmos cromatogramas do APÊNDICE C, pôde-se observar que o pico cromatográfico aparece em todos os brancos, sendo esse critério aprovado nesse teste. O cálculo do coeficiente de variação também mostrou resultados positivos, sendo o mais alto de 1,47% para urina, estando ambos abaixo de 2%.

Tabela 15 – Média e desvio padrão para o teste da interferência da matriz nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina	Plasma
	t_r (min)	t_r (min)
Branco 01	1,95	1,95
Branco 02	1,94	1,95
Branco 03	1,90	1,94
Branco 04	1,89	1,95
Branco 05	1,90	1,94
Branco 06	1,90	1,94
Branco 07	1,89	1,95
Branco 08	1,96	1,95
Branco 09	1,90	1,95
Branco 10	1,95	1,94
Média	1,92	1,95
s	0,0282	0,0052
CV%	1,47	0,27

t_r : tempo de retenção; s: desvio-padrão; CV%: coeficiente de variação percentual.

6.3.4) Repetitividade

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos no teste de repetitividade, que são as áreas dos picos observados nos cromatogramas para o padrão interno e clenbuterol, ambos com o fragmento mais intenso. Além disso, mostra a razão dessas áreas e o resultado dos cálculos da média, desvio-padrão / desvio-padrão das razões das áreas e o coeficiente de variação percentual / desvio-padrão relativo percentual.

Em seguida, a Tabela 17 indica as razões das áreas em ordem crescente de valor e os resultados do teste de Grubbs para a avaliação de valores aberrantes no experimento.

A dispersão dos resultados encontra-se dentro dos critérios definidos, sendo em ambas as matrizes o valor do desvio-padrão relativo percentual menor que 20%. Pode ser observado mais uma vez, que o plasma é uma matriz menos complexa, apresentando melhores resultados.

Tabela 16 – Dispersão dos resultados no teste de repetitividade nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina			Plasma		
	P.I.	Analito	Razão	P.I.	Analito	Razão
Branco 01	9,23E7	8,29E5	0,0090	6,06E7	1,29E5	0,0021
Branco 02	9,86E7	6,65E5	0,0067	5,58E7	1,16E5	0,0021
Branco 03	9,35E7	7,78E5	0,0083	5,43E7	1,03E5	0,0019
Branco 04	1,02E8	5,26E5	0,0052	5,69E7	1,11E5	0,0020
Branco 05	1,01E8	7,37E5	0,0073	5,60E7	1,08E5	0,0019
Branco 06	1,01E8	6,55E5	0,0065	6,38E7	1,19E5	0,0019
Branco 07	1,01E8	6,07E5	0,0060	5,47E7	1,15E5	0,0021
Média	9,85E7	6,85E5	0,0070	5,74E7	1,14E5	0,0020
s/s _r	3,97E6	1,04E5	0,0013	3,48E6	8,36E3	0,0001
CV/RSD%	4,03	15,16	18,9	6,07	7,31	5,4

P.I.: padrão interno; s: desvio-padrão; s_r: desvio-padrão das razões das áreas; CV%: coeficiente de variação percentual; RSD%: desvio-padrão relativo percentual.

Tabela 17 – Razões entre as áreas e os resultados do teste de Gurbbs para avaliação dos valores aberrantes no teste de repetitividade nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina	Amostra	Plasma
	Razão		Razão
Branco 04	0,0052	Branco 03	0,0019
Branco 07	0,0060	Branco 05	0,0019
Branco 06	0,0065	Branco 06	0,0019
Branco 02	0,0067	Branco 04	0,0020
Branco 05	0,0073	Branco 01	0,0021
Branco 03	0,0083	Branco 02	0,0021
Branco 01	0,0090	Branco 07	0,0021
$G_{Inferior}$	1,395	$G_{Inferior}$	1,190
$G_{Superior}$	1,501	$G_{Superior}$	1,263

Comparando o valor tabelado de $G = 2,020$ para 7 amostras e $p = 0,025$, com os valores calculados de $G_{Inferior}$ e $G_{Superior}$, percebe-se que não há nenhum valor

aberrante no grupo de resultados, uma vez que os valores calculados são menores que 2,020. Com isso, o teste de repetitividade obteve bons resultados na concentração do LD definido, tanto para urina quanto para plasma.

6.3.5) Capacidade de identificação

Os resultados dos cálculos das médias das intensidades relativas e do tempo de retenção para cada fragmento, está representado nas Tabelas 18 e 19 para a matriz de urina e plasma, respectivamente. A avaliação foi realizada levando em consideração os dois parâmetros, e se esses valores para cada fragmento estavam dentro da janela de tolerância calculada pela média.

Com os resultados obtidos no teste da capacidade de identificação, pôde-se concluir que existe uma confiabilidade na identificação do clenbuterol, nas concentrações do LD, em ambas as matrizes. Os parâmetros analisados estavam dentro das janelas de tolerância para todos os fragmentos dos brancos diferentes.

Tabela 18 – Avaliação da capacidade de identificação para a matriz de urina.

Amostra	Área	t_r (min)	Int. Relativa	Avaliação
<i>m/z</i> 277,0 Da → 203,0 Da				
Branco 01	829000	1,91	100,0	OK
Branco 02	665000	1,91	100,0	OK
Branco 03	778000	1,91	100,0	OK
Branco 04	526000	1,89	100,0	OK
Branco 05	737000	1,91	100,0	OK
Branco 06	655000	1,91	100,0	OK
Branco 07	607000	1,92	100,0	OK
Média	685285,71	1,91	100,00	-----
<i>m/z</i> 277,0 Da → 131,9 Da				
Branco 01	195000	1,91	23,5	OK
Branco 02	176000	1,91	26,5	OK
Branco 03	191000	1,91	24,6	OK
Branco 04	149000	1,89	28,3	OK
Branco 05	186000	1,91	25,2	OK
Branco 06	176000	1,91	26,9	OK
Branco 07	169000	1,91	27,8	OK
Média	177428,57	1,91	26,12	-----
<i>m/z</i> 277,0 Da → 167,9 Da				
Branco 01	194000	1,90	23,4	OK
Branco 02	169000	1,90	25,4	OK
Branco 03	174000	1,90	22,4	OK
Branco 04	140000	1,88	26,6	OK
Branco 05	190000	1,91	25,8	OK
Branco 06	169000	1,90	25,8	OK
Branco 07	167000	1,90	27,5	OK
Média	171857,14	1,90	25,27	-----

t_r : tempo de retenção; m/z : razão massa/carga.

Tabela 19 – Avaliação da capacidade de identificação para a matriz de plasma.

Amostra	Área	t_r (min)	Int. Relativa	Avaliação
<i>m/z 277,0 Da → 203,0 Da</i>				
Branco 01	129000	1,92	100,0	OK
Branco 02	116000	1,91	100,0	OK
Branco 03	103000	1,91	100,0	OK
Branco 04	111000	1,92	100,0	OK
Branco 05	108000	1,92	100,0	OK
Branco 06	119000	1,92	100,0	OK
Branco 07	115000	1,92	100,0	OK
Média	114428,57	1,92	100,00	-----
<i>m/z 277,0 Da → 131,9 Da</i>				
Branco 01	36900	1,92	28,6	OK
Branco 02	34300	1,91	29,6	OK
Branco 03	31500	1,90	30,6	OK
Branco 04	33800	1,92	30,5	OK
Branco 05	28600	1,91	26,5	OK
Branco 06	35400	1,92	29,7	OK
Branco 07	33600	1,92	29,2	OK
Média	33442,86	1,91	29,24	-----
<i>m/z 277,0 Da → 167,9 Da</i>				
Branco 01	38700	1,92	30,0	OK
Branco 02	33600	1,91	29,0	OK
Branco 03	30200	1,90	29,3	OK
Branco 04	35000	1,91	31,5	OK
Branco 05	30100	1,91	27,9	OK
Branco 06	34600	1,91	29,1	OK
Branco 07	32800	1,91	28,5	OK
Média	33571,43	1,91	29,33	-----

t_r : tempo de retenção; m/z : razão massa/carga.

6.3.6) Rendimento de extração

Da mesma forma que o teste da repetitividade, a Tabela 20 apresenta as áreas dos picos para os fragmentos mais intensos do padrão interno e clembuterol, assim como o resultado dos cálculos das razões e médias dos valores. A Tabela 21 mostra as razões das áreas em ordem crescente e os resultados do teste de Grubbs para avaliação de valores aberrantes.

O teste de Grubbs não apresentou valor aberrante para as amostras do teste do rendimento de extração, uma vez que os valores de G são inferiores a 2,020, valor tabelado para 7 amostras e $p = 0,025$.

Tabela 20 – Razão das áreas do analito e padrão interno para o rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina			Plasma		
	P.I.	Analito	Razão	P.I.	Analito	Razão
Branco 01	9,78E7	1,33E6	0,0136	6,40E7	1,40E5	0,0022
Branco 02	8,66E7	5,25E5	0,0061	6,50E7	1,44E5	0,0022
Branco 03	9,77E7	1,07E6	0,0110	6,32E7	1,48E5	0,0023
Branco 04	9,76E7	1,13E6	0,0116	6,58E7	1,39E5	0,0021
Branco 05	1,01E8	1,03E6	0,0102	6,80E7	1,48E5	0,0022
Branco 06	9,89E7	1,24E6	0,0125	5,61E7	1,28E5	0,0023
Branco 07	9,52E7	7,78E5	0,0082	6,55E7	1,42E5	0,0022
Média	9,64E7	1,01E6	0,0105	6,39E7	1,41E5	0,0022

P.I.: padrão interno.

Tabela 21 – Razões entre as áreas e os resultados do teste de Grubbs para avaliação dos valores aberrantes no teste do rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina	Amostra	Plasma
	Razão		Razão
Branco 02	0,0061	Branco 04	0,0021
Branco 07	0,0082	Branco 01	0,0022
Branco 05	0,0102	Branco 02	0,0022
Branco 03	0,0110	Branco 05	0,0022
Branco 04	0,0116	Branco 07	0,0022
Branco 06	0,0125	Branco 03	0,0023
Branco 01	0,0136	Branco 06	0,0023
$G_{Inferior}$	1,690	$G_{Inferior}$	1,294
$G_{Superior}$	1,218	$G_{Superior}$	1,691

Por último, a Tabela 22 indica os resultados do rendimento de extração para cada branco, utilizando os valores da Tabela 16 e 20, do teste de repetitividade e rendimento, respectivamente. Uma média do rendimento de todos os brancos foi realizada, de forma a obter um valor de rendimento global para o experimento.

Tabela 22 – Resultados do rendimento de extração nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Rendimento de extração (%)	
	Urina	Plasma
Branco 01	86,0	96,2
Branco 02	64,6	94,0
Branco 03	79,7	85,8
Branco 04	49,4	88,2
Branco 05	69,9	87,2
Branco 06	62,1	84,3
Branco 07	57,6	95,0
Média	67,0	90,1

Foi determinado pelo LAB RES, um limite aceitável de 50% do rendimento de extração, seguindo as orientações do DOQ-CGCRE-008, sendo melhor quanto mais próximo de 100%. Com os resultados obtidos, observa-se que todos os rendimentos estão dentro do aceitável, sendo o menor de 67,0% para urina. Mais uma vez foi visto a facilidade da análise na matriz de plasma, em comparação com a urina.

6.3.7) Arraste

A Tabela 23 apresenta as áreas nos cromatogramas, no tempo de retenção do fragmento mais intenso esperado para o clembuterol, dos brancos testados para ambas as matrizes de urina e plasma no teste do arraste.

Tabela 23 – Resultados do teste do arraste nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Área no t_r do analito	
	Urina	Plasma
Branco de matriz	1,98E5	3,10E4
Branco fortificado	8,83E7	8,77E7
Branco de matriz (Reinjeção)	1,80E5	1,09E5

t_r : tempo de retenção.

É observado para a matriz de urina, que a reinjeção do branco de matriz não aumentou a área no tempo de retenção do clembuterol. Pelo contrário, apresentou um valor um pouco menor, não apresentando arraste. Para a matriz de plasma, a área da reinjeção apresentou um valor maior do que 3 vezes o valor da primeira injeção. Porém, 50 vezes o seu valor, continua sendo menor do que a área do analito no branco fortificado, não caracterizando um arraste. Os cálculos podem ser observados a seguir:

- Urina: $1,80E5 < 1,98E5$ (Não é considerado arraste)
- Plasma: $1,09E5 > 3,10E4 \times 3 = 9,30E4$ (Segue para o próximo critério)
 $1,09E5 \times 50 = 5,45E6 < 8,77E7$ (Não é considerado arraste)

Esses resultados positivos indicam uma boa construção do gradiente da corrida cromatográfica. Possui um tempo suficiente para o equilíbrio da coluna, entre uma injeção e outra, sem a retenção da substância na mesma entre as injeções, além de indicar uma boa limpeza da seringa entre uma injeção e outra, sem carregar contaminantes para o próximo frasco *vial*.

6.3.8) Robustez

As áreas dos picos do fragmento mais intenso do padrão interno e do clenbuterol podem ser encontrados nas Tabelas 24 e 25, para o Grupo 01 e 02, respectivamente. Além disso, foram calculadas as razões das áreas, a média, desvio-padrão e coeficiente de variação percentual para a avaliação do teste da robustez.

Tabela 24 – Resultados do teste da robustez para o Grupo 01 nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina (0,20 ng/mL)			Plasma (0,025 ng/mL)		
	P.I.	Analito	Razão	P.I.	Analito	Razão
Branco 01	9,13E7	7,78E5	0,0085	5,00E7	1,12E5	0,0022
Branco 02	9,37E7	7,63E5	0,0081	4,77E7	1,04E5	0,0022
Branco 03	9,04E7	6,52E5	0,0072	4,94E7	1,23E5	0,0025
Branco 04	8,54E7	6,57E5	0,0077	5,09E7	1,18E5	0,0023
Branco 05	8,84E7	7,12E5	0,0081	4,82E7	1,04E5	0,0022
Branco 06	8,80E7	6,21E5	0,0071	4,97E7	1,13E5	0,0023
Branco 07	8,18E7	5,87E5	0,0072	5,00E7	1,17E5	0,0023
Média	-----	-----	0,0077	-----	-----	0,0023
s	-----	-----	0,0006	-----	-----	0,0001
CV%	-----	-----	7,36	-----	-----	4,91

P.I.: padrão interno; s: desvio-padrão; CV%: coeficiente de variação percentual.

Para as alterações realizadas no procedimento experimental do Grupo 01, tanto a matriz de urina quanto a de plasma, apresentaram valores de CV% abaixo de 20%. Isso indica que para essas modificações o método se mostra robusto, sem apresentar muitas alterações no resultado final.

Tabela 25 – Resultados do teste da robustez para o Grupo 02 nas amostras de urina e plasma.

Amostra	Urina (0,20 ng/mL)			Plasma (0,025 ng/mL)		
	P.I.	Analito	Razão	P.I.	Analito	Razão
Branco 01	7,74E7	5,41E5	0,0070	4,84E7	1,19E5	0,0025
Branco 02	7,40E7	2,10E5	0,0028	4,50E7	1,20E5	0,0027
Branco 03	8,20E7	5,35E5	0,0065	4,65E7	1,16E5	0,0025
Branco 04	7,75E7	4,57E5	0,0059	4,50E7	1,25E5	0,0028
Branco 05	8,45E7	3,09E5	0,0037	4,65E7	1,22E5	0,0026
Branco 06	8,46E7	6,11E5	0,0072	4,56E7	1,22E5	0,0027
Branco 07	8,91E7	6,42E5	0,0072	4,59E7	1,27E5	0,0028
Média	-----	-----	0,0058	-----	-----	0,0026
s	-----	-----	0,0018	-----	-----	0,0001
CV%	-----	-----	31,13	-----	-----	4,68

P.I.: padrão interno; s: desvio-padrão; CV%: coeficiente de variação percentual.

No Grupo 02, observa-se para a matriz de plasma, um valor de CV% abaixo de 20% também, porém a matriz de urina apresentou um valor de 31,13%. Foi analisado, então, pela correlação de Horwitz, onde o CV% teórico calculado para o LD da urina possui o valor de 57%, sendo o obtido experimentalmente ainda menor. Isso significa que o método apresenta uma robustez para as modificações dos dois grupos, sendo notado que o Grupo 02 impactou mais nos resultados com a matriz de urina.

7) PROPOSTAS DE MELHORIA PARA O MÉTODO QUALITATIVO

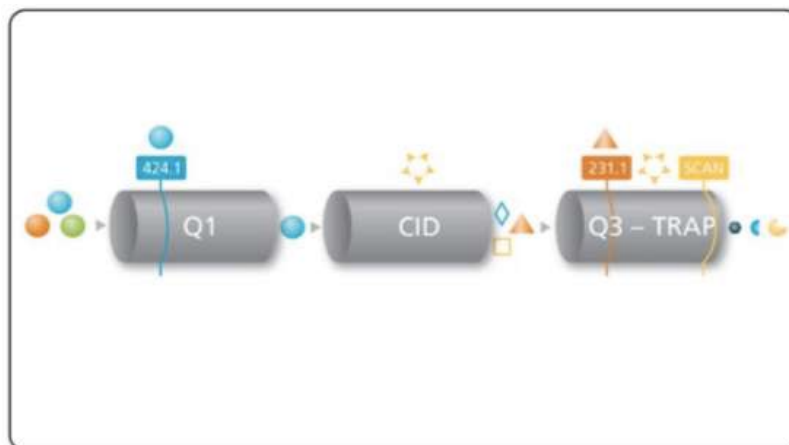
Pôde ser observado com os resultados obtidos na validação do método qualitativo, que somente o LD do clenbuterol para urina não foi alcançado. Todos os outros parâmetros analisados, se encontraram dentro dos valores almejados e o método foi validado com esse LD.

Porém, com o intuito de alcançar o LD de 0,1 ng/mL do clenbuterol em urina de equinos, novas propostas de melhoria do método foram realizadas. Entre elas estão: um novo modo de varredura no espectrômetro de massas e um novo gradiente de solventes para a cromatografia.

7.1) Novo método de aquisição

Foi utilizado como proposta de um novo método de aquisição, um modo de varredura do tipo LIT (*Linear Ion Trap*), chamado MS3. Ele possui os mesmos princípios iniciais do MRM, um íon é selecionado no Q1 e é transmitido para o Q2, onde ocorre a fragmentação pelo gás de dissociação. Após eles serem transmitidos para o Q3, somente um fragmento é selecionado e isolado pela LIT. Ocorre, então, uma nova fragmentação no Q3, com uma energia de excitação que gera fragmentos de segunda geração. Por último, eles são transmitidos para o detector em diferentes velocidades definidas pelo usuário. Um esquema do novo método de aquisição se encontra na Figura 20.

Figura 20 – Esquema do método de aquisição com MS3.



Fonte: *MRM³ Quantitation for Highest Selectivity in Complex Matrices*, Sciex (2017).

Para definir a energia de excitação (AF2) utilizada no Q3 para as fragmentações de segunda geração, foi utilizada uma otimização manual no Analyst. Foi escolhido como precursor de segunda geração o fragmento de 203,0 Da do clenbuterol, com ele realizou-se uma rampa de energia de excitação, para observar aquela que gerava a maior intensidade de sinal dos fragmentos. Assim, o valor para o AF2 foi definido como 0,062 V e os fragmentos de segunda geração utilizados foram o 132,0 e 168,0 Da.

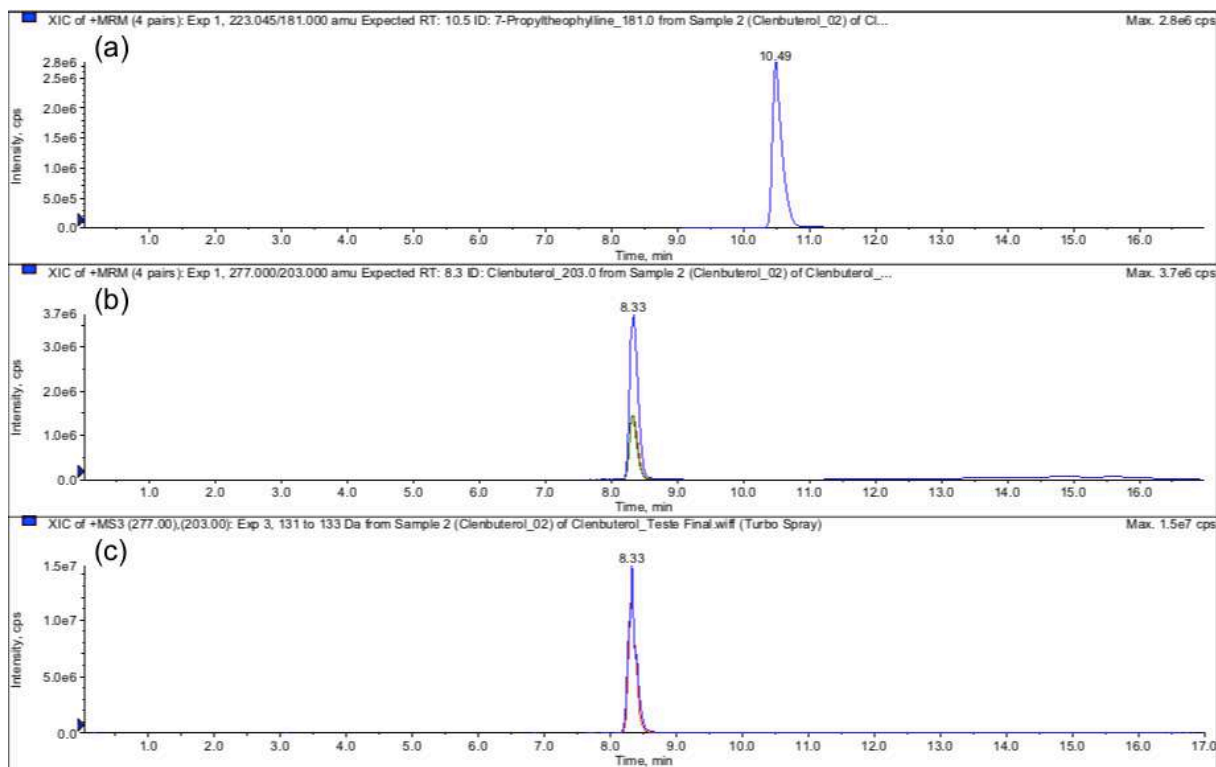
7.2) Novo gradiente da cromatografia líquida

Optou-se por desenvolver um novo gradiente da cromatografia, de forma a deslocar o clenbuterol do início da análise para o meio. Dessa forma, as substâncias foram eluídas no meio da análise cromatográfica, evitando o começo que possui um sinal mais instável do detector. Para a realização desse deslocamento, foi reduzida a proporção inicial de metanol, tornando a fase móvel mais polar inicialmente, o que fez com que as substâncias fossem mais retidas na coluna cromatográfica. Com isso, foi definido um tempo total de 17 minutos de corrida, partindo de uma proporção inicial de 10% até 50% de metanol com aditivos.

Os resultados obtidos no teste da nova análise cromatográfica nas amostras de urina podem ser observados na Figura 21. O item (a) é referente ao +MRM da 7-propilteofilina; (b) ao +MRM do clenbuterol; (c) ao +MS3 do clenbuterol. Foi observado o novo tempo de retenção do clenbuterol de 8,33 minutos e da 7-propilteofilina de 10,49 minutos.

Com esses valores, foi ativada uma função no método +MRM, chamada *Scheduled MRM*, onde foi inserido os tempos de retenção esperados para os analitos. A sensibilidade do método é aumentada por só procurar por aqueles fragmentos em uma janela de tempo pequena, que cobre o tempo de retenção esperado.

Figura 21 – Cromatograma da nova proposta de método de análise cromatográfica para as amostras de urina: (a) fragmento 181,0 Da da 7-propilteofilina no modo +MRM; (b) fragmentos 203,0, 132,0 e 168,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (c) fragmentos 132,0 e 168,0 Da do clenbuterol no modo +MS3.



7.3) Determinação do novo limite de detecção

Para a determinação do novo limite de detecção, foram utilizados os mesmos critérios anteriores para uma relação de sinal/ruído maior que 3. Foi comparado nos cromatogramas, a diferença dessa relação para os fragmentos 132,0 e 168,0 Da nos modos de varredura +MRM e +MS3. Avaliaram-se 5 concentrações diferentes para o teste, 0,50, 0,20, 0,10, 0,05 e 0,01 ng/mL, todas realizadas em duplicatas para a confiabilidade do resultado da extração.

Os resultados estão apresentados na Tabela 26 e os cromatogramas, com as relações de sinal/ruído referentes a cada caso, no APÊNDICE D. O item (a) do cromatograma é referente ao fragmento 203,0 Da do clenbuterol para o +MRM e os itens (b) e (c), comparam os fragmentos 132,0 e 168,0 Da no +MRM e +MS3, respectivamente.

Tabela 26 – Relação sinal/ruído do novo teste de limite de detecção nas amostras de urina.

	Concentração (ng/mL)	Fragmentos (Da)	Branco de urina fortificado	
			S/N (1)	S/N (2)
+MRM	0,50	203,0	14,7	17,4
		132,0	8,5	12,0
		168,0	44,1	55,4
	0,20	203,0	6,3	7,8
		132,0	3,0	4,0
		168,0	18,1	20,3
	0,10	203,0	7,5	6,7
		132,0	3,2	3,9
		168,0	18,2	19,3
	0,05	203,0	2,0	N > S
		132,0	0,7	N > S
		168,0	4,2	2,6
	0,01	203,0	N > S	N > S
		132,0	N > S	N > S
		168,0	1,8	1,6
+MS3	0,50	132,0	54,2	81,0
		168,0	118,6	87,9
	0,20	132,0	32,1	41,3
		168,0	28,2	38,9
	0,10	132,0	26,7	41,1
		168,0	43,0	27,4
	0,05	132,0	12,2	3,2
		168,0	11,6	6,6
	0,01	132,0	6,4	2,3
		168,0	2,0	5,1

S/N: razão sinal/ruído; N > S: ruído maior que sinal; +MRM: modo de varredura MRM com polaridade positiva; +MS3: modo de varredura MS3 com polaridade positiva.

É possível observar com esses resultados, um aumento significativo da relação sinal/ruído ao utilizar o modo de varredura +MS3. Foi possível alcançar valores de sinal/ruído maior que 3, até para a concentração de 0,05 ng/mL nesse modo de varredura, que é metade do ISL definido pela IFHA. A utilização do *Scheduled MRM* possibilitou, também, a obtenção de uma relação sinal/ruído maior que 3, para a concentração de 0,10 ng/mL no modo +MRM antes não alcançada, com o mesmo *pool* de urina utilizado anteriormente.

A próxima etapa realizada foi a confirmação do LD para esse novo método criado. Para ambos os modos de varredura, +MRM e +MS3, foi utilizada a concentração de 0,10 ng/mL, uma vez que é o nosso limite mínimo definido. Os valores do sinal/ruído para os 10 brancos de origens diferentes, em cada um dos modos de varredura e fragmentos, se encontram na Tabela 27. Os cromatogramas podem ser encontrados no APÊNDICE E.

Tabela 27 – Relação sinal/ruído para a confirmação do limite de detecção do novo método de análise realizado para amostras de urina.

Amostra	+MRM			+MS3	
Fragmentos (Da)	203,0	132,0	168,0	132,0	168,0
Branco 01	N > S	N > S	20,8	9,4	21,6
Branco 02	4,8	3,0	26,4	22,3	55,6
Branco 03	1,8	1,2	25,7	19,5	67,4
Branco 04	9,4	13,4	29,6	49,3	44,4
Branco 05	7,6	5,0	17,4	48,8	54,2
Branco 06	9,3	3,3	17,8	39,6	52,0
Branco 07	7,9	3,4	9,9	35,0	33,6
Branco 08	6,5	0,7	13,0	21,0	21,4
Branco 09	0,6	N > S	22,9	8,6	37,5
Branco 10	2,9	1,6	12,6	12,0	27,6

+MRM: modo de varredura MRM com polaridade positiva; +MS3: modo de varredura MS3 com polaridade positiva; N > S: ruído maior que sinal.

Foram observadas em diversas urinas, que o LD de 0,10 ng/mL para o método do +MRM, não atende ao critério de sinal/ruído maior que 3, concluindo que tanto a ferramenta do Scheduled MRM, quanto a alteração do gradiente da cromatografia, não alteram muito a sensibilidade da análise. Porém, o método do +MS3, apresentou resultados muito bons em comparação ao anterior, mostrando ser um modo de varredura muito promissor para obtenção de melhores relações de sinal/ruído em matrizes complexas, como a urina de equinos.

8) CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento de extração líquido-líquido em urina e plasma de equinos, para obtenção das substâncias de interesse em fase móvel, já estava desenvolvido pelo LAB RES para outras substâncias e foi aproveitado para o método de detecção do clembuterol. O procedimento se mostrou trabalhoso, levando quase um dia inteiro de trabalho para finalizar cada um, sendo realizados treinamentos para aperfeiçoamento das técnicas. Outros treinamentos no equipamento QTRAP 5500 da Sciex foram oferecidos pelo LAB RES para melhor entendimento dos conceitos e manuseio do software Analyst.

O desenvolvimento do método para detecção de clembuterol em urina e plasma de equinos foi concluído com sucesso. O ISL da urina não foi alcançado, porém, por ter obtido um LD muito próximo do desejado, 0,20 ng/mL, o método foi validado e inserido na rotina do laboratório. A matriz de plasma mostrou ser muito menos complexa que a urina, sendo observado, em diversos testes, resultados melhores e cromatogramas com menos ruídos, conseguindo até ser reduzido seu LD para uma concentração de 0,025 ng/mL.

Todos os resultados obtidos nos testes realizados no Capítulo 6, para a validação do método em ambas as matrizes, foram satisfatórios e com resultados dentro do desejável pelas práticas adotadas pelo LAB RES. Além disso, a construção do passo a passo, para a validação de um método qualitativo, foi auxiliada pelas normas dos documentos regulatórios citados e adotadas pelo LAB RES.

Com os conhecimentos adquiridos no QTRAP 5500 da Sciex, foi sugerido um novo modo de varredura com o intuito de reduzir o limite de detecção na matriz de urina e atender os limites estabelecidos pela IFHA. O novo método se mostrou muito promissor com os testes realizados, apresentando melhoras significativas na relação do sinal/ruído e possibilitou a redução do LD de forma a alcançar o desejado.

A limitação desse método envolve a avaliação da intensidade de apenas 2 fragmentos, formados pelo precursor de segunda geração no Q3. Como estabelecido pelos guias de validação e desenvolvimento de métodos das autoridades turfísticas antidopagem, é preciso monitorar 3 íons em uma análise, sendo assim, deve-se adaptar o procedimento para atender as normas. Além disso, os outros testes para a validação do método precisam ser avaliados, como: repetitividade, capacidade de

identificação, para saber se o novo método atende os critérios adotados pelo LAB RES. Tais testes não foram realizados pelo curto espaço tempo em que o projeto foi desenvolvido e com a demanda de outros projetos realizados pelo laboratório.

Embora o ISL do clenbuterol em urina de equinos para controle de dopagem não tenha sido alcançado, o método desenvolvido foi aplicado a rotina do LAB RES para a confirmação de suspeitas de clenbuterol em ambas matrizes. Por ter sido alcançado um valor muito próximo e as amostras que se mostraram positivas estavam muito acima dessa concentração estipulada, sendo o resultado informado para as instituições turfísticas que possivelmente tomaram suas atitudes contra esses cavalos dopados, mostrando a importância do trabalho no âmbito do esporte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Official Racing Chemists. AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry. 2016. Disponível em: <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-modified-23-aug-16>. Acesso em: 07/01/2020.

Association of Racing Commissioners International. About ARCI. 2019. Disponível em: <https://www.arci.com/about/#About>. Acesso em: 14/09/2019.

Association of Racing Commissioners International. ARCI Controlled Therapeutic Medication Schedule for Horses – Version 4.0. 2017. Disponível em: https://arci.blob.core.windows.net/webdocs/2017_04_CTS_V4_0.pdf. Acesso em: 17/09/2019.

ChemSpider. 7-Propyltheophylline. 2019. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.740206.html?rid=37ea727e-e0bc-4474-8c75-7d994c4484b4>. Acesso em: 25/09/2019.

ChemSpider. Clenbuterol. 2019. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2681.html?rid=9eaebed8-b48f-41c1-b598-55b63530bd74>. Acesso em: 14/09/2019.

DA SILVA, Cassia Maria Lins. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de anfetamina, metanfetamina e famprofasona em sangue e fígado após administração controlada de famprofasona em suínos. 2018. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/1/7835/1/Silva%2C%20Cassia%20Maria%20Lins%20da%20-%20Tese%2C%202018.pdf>. Acesso em: 07/01/2020.

DrugBank. Clenbuterol. 2019. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01407>. Acesso em: 14/09/2019.

ENTINI, Carlos Eduardo. Cerveja foi o primeiro doping. Estadão. 2012. Disponível em: <https://esportes.estadao.com.br/noticias/geral,cerveja-foi-o-primeiro-doping-imp-,909635>. Acesso em: 06/01/2020.

FERRAZ, Guilherme de Camargo. Resposta endócrinas, metabólicas, cardíacas e hematológicas de equinos submetidos ao exercício intenso e à administração de cafeína, aminofilina e clenbuterol. 2006. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101261/ferraz_gc_dr_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 14/09/2019.

GUAN, Fuyu; UBOH, Cornelius E.; SOMA, Lawrence R.; LUO, Yi; LI, Runbo; BIRKS, Eric K.; TELEIS, Donna; RUDY, Jeffrey A.; TSANG, Deborah S.. *Quantification of clenbuterol in equine plasma, urine and tissue by liquid chromatography coupled on-line with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 16, p. 1642-1651, jun, 2002.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 07/01/2020.

International Federation of Horseracing Authorities. About IFHA, Mission. 2019. Disponível em: <https://www.ifhaonline.org/default.asp?section=About%20IFHA&area=0>. Acesso em: 14/09/2019.

International Federation of Horseracing Authorities. International Screening Limits-Urine. 2019. Disponível em: <https://www.ifhaonline.org/default.asp?section=IABRW&area=1>. Acesso em: 17/09/2019.

International Laboratory Accreditation Cooperation. Accreditation Requirements and Operating Criteria for Horseracing Laboratories. ILAC-G7:02/2016. 2016. Disponível em: <https://ilac.org/publications-and-resources/ilac-guidance-series>. Acesso em: 07/01/2020.

KONERMANN, Lars; AHADI, Elias; RODRIGUEZ, Antony D.; VAHIDI, Siavash. *Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization.* Anal. Chem. 85, 1, 2-9, 2013.

LEHNER, A. F.; HARKINS, J. D.; KARPIESIUKE, W.; WOODS, W. E.; ROBINSON, N. E.; DIRIKOLU, L.; FISHER, M.; TOBIN, T.. *Clenbuterol in the Horse: Confirmation and Quantitation of Serum Clenbuterol by LC-MS-MS after Oral and Intratracheal Administration.* Journal of Analytical Toxicology, v. 25, jun, 2001.

LIMA, India Maria Hiluf. Confiabilidade metrológica do Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro. Estudo de caso: validação de método analítico para determinação de cafeína em urina de cavalos de corrida. 2004. Disponível em: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/5563/5563_4.PDF. Acesso em: 14/09/2019.

LOURENÇO, Emerson L. B.. Análises Forenses. Disponível em: www2.td.utfpr.edu.br/encitec/toxicologia_forense.pptx. Acesso em: 25/09/2019.

RADLER, Francisco de Aquino Neto. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 7, n. 4, p. 138-148, jul/ago, 2001.

Sciex. *5500 Series of Instruments, System User Guide*. 2017. Disponível em: <https://sciex.com/Documents/manuals/5500-system-user-guide-en.pdf>. Acesso em: 30/09/2019.

Sciex. *MRM³ Quantitation for Highest Selectivity in Complex Matrices, Innovations on the QTRAP[®] 4500, 5500, 6500 and 6500+ LC-MS/MS Systems*. 2017. Disponível em: https://sciex.com/Documents/tech%20notes/MRM3_Quantitation_tech_oView.pdf. Acesso em: 01/12/2019.

Sciex. *Turbo VTM Ion Source, Operator Guide*. 2014. Disponível em: <https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/turbo-v-operator-guide-en.pdf>. Acesso em: 03/10/2019.

Sciex. *Using Your QTRAP LC/MS/MS System at Full Potential, A Quick-Start Guide to Upgrade an MRM Acquisition Method to an MRM-IDA-EPI Acquisition Method in 6 Easy Steps using Analyst Software*. 2013. Disponível em: <https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/Quick-Reference-Card-Using-Your-QTRAP-System-Full-Potential.pdf>. Acesso em: 13/10/2019.

SILVA, Julio C. J.. QUI 070, Química Analítica V, Análise Instrumental, Aula 11 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 2014. Disponível em: https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula_11-CL_08_07_14.pdf. Acesso em: 30/09/2019.

World Anti-Doping Agency. *Prohibited List*. 2019. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf. Acesso em: 14/09/2019.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA PESQUISA CIENTÍFICA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 21 de março de 2019

Prezado Professor Francisco Radler de Aquino Neto

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Estudo de detecção e estabilidade de fármacos com o uso potencial como agentes dopantes em equinos.”, protocolo nº 142/18**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **19/02/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 21/03/2022
Espécie/linhagem	<i>Equus caballus</i> / Cavalos domésticos
Nº de animais	4 animais
Peso/idade	450kg/ 13 anos
Sexo	Machos
Origem	Jockey Club Brasileiro - Praça Santos Dumont, 31- Gávea. CNPJ: 33.621.756/0003.79

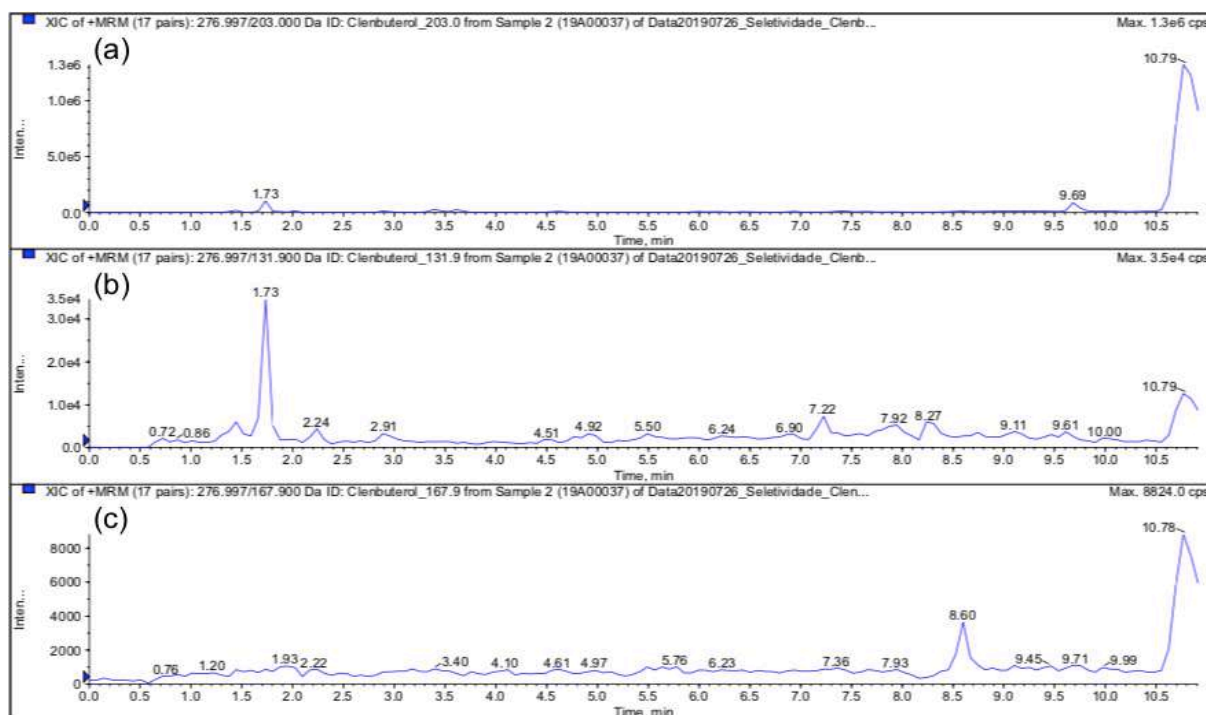
Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

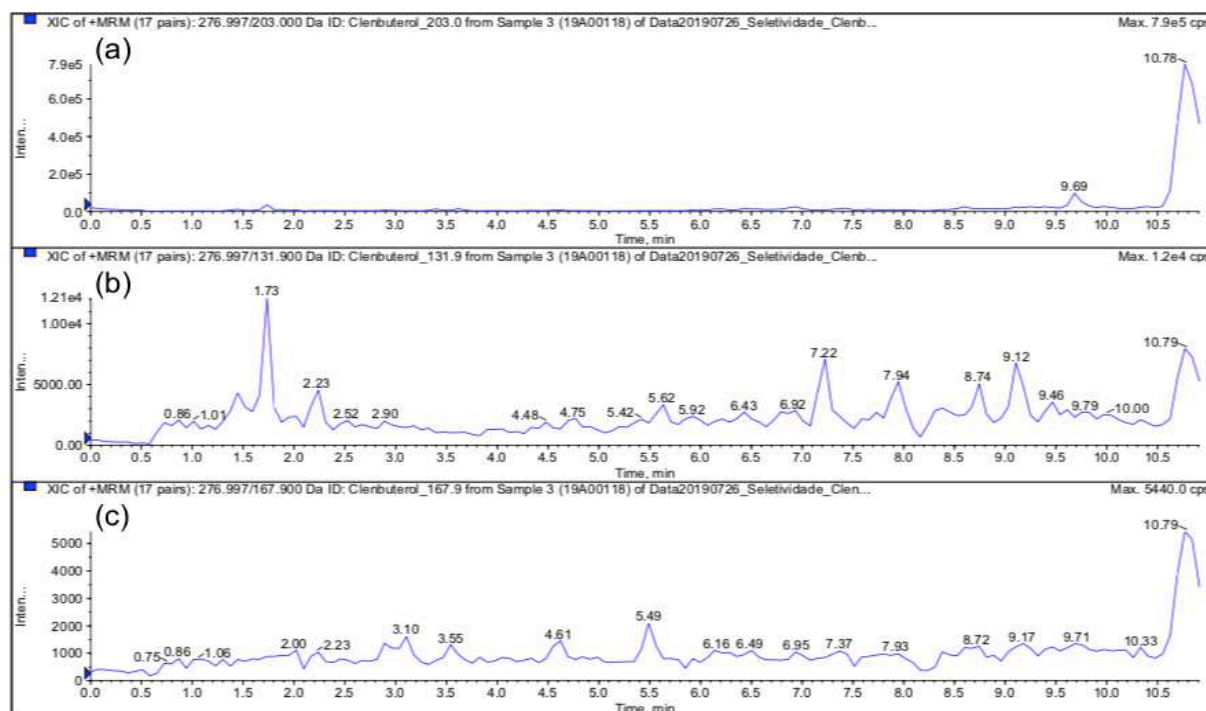
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS PARA O TESTE DA SELETIVIDADE

(a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.

[1] Matriz: Urina – Branco 01.

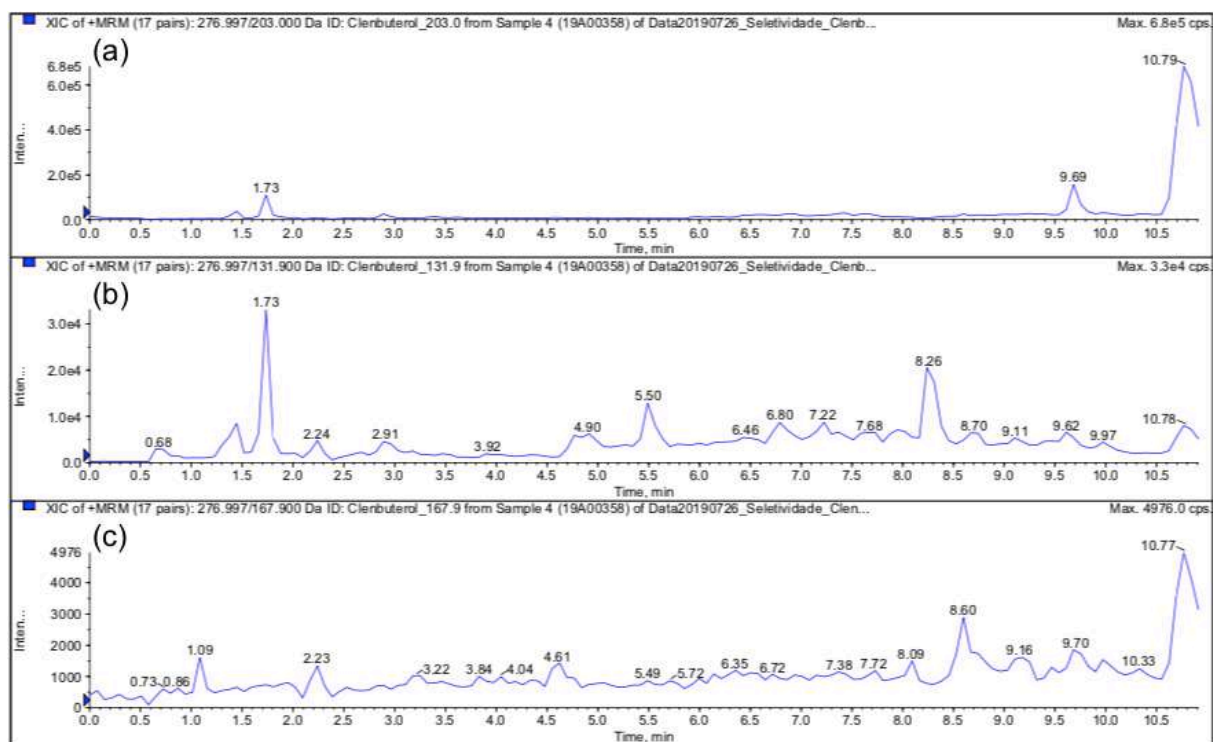


[2] Matriz: Urina – Branco 02.

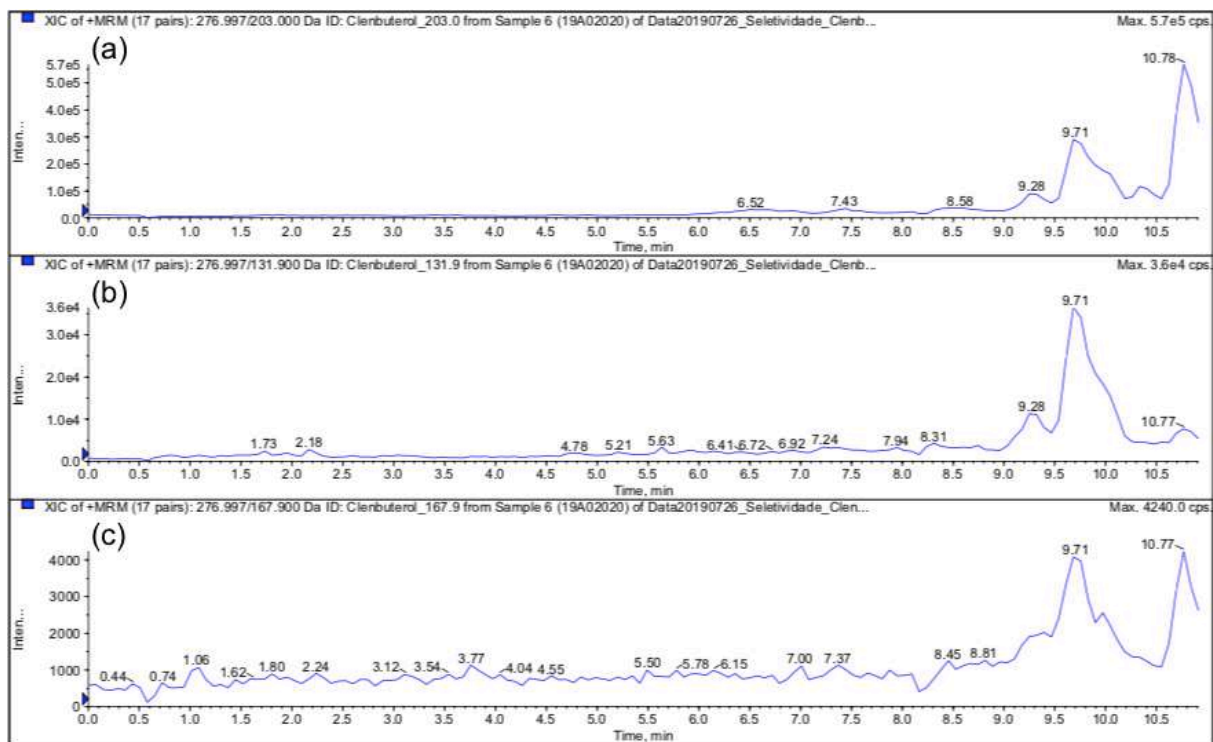


-- APÊNDICE A --

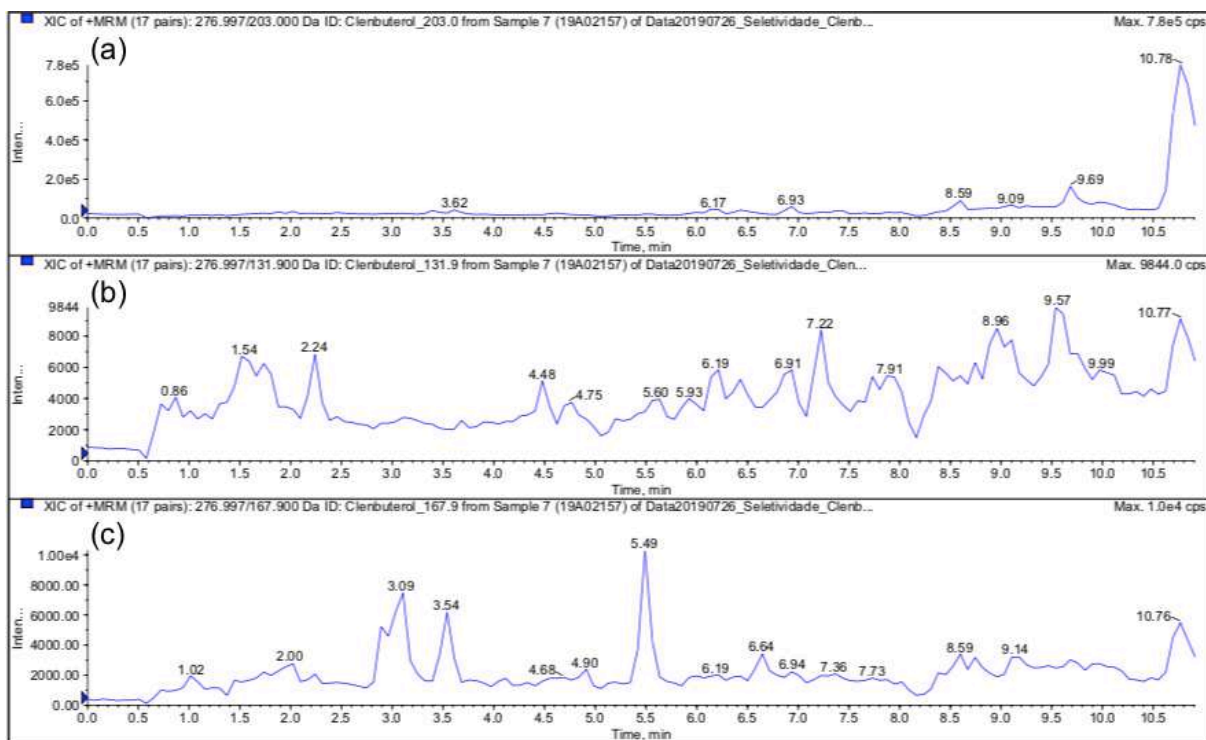
[3] Matriz: Urina – Branco 03.



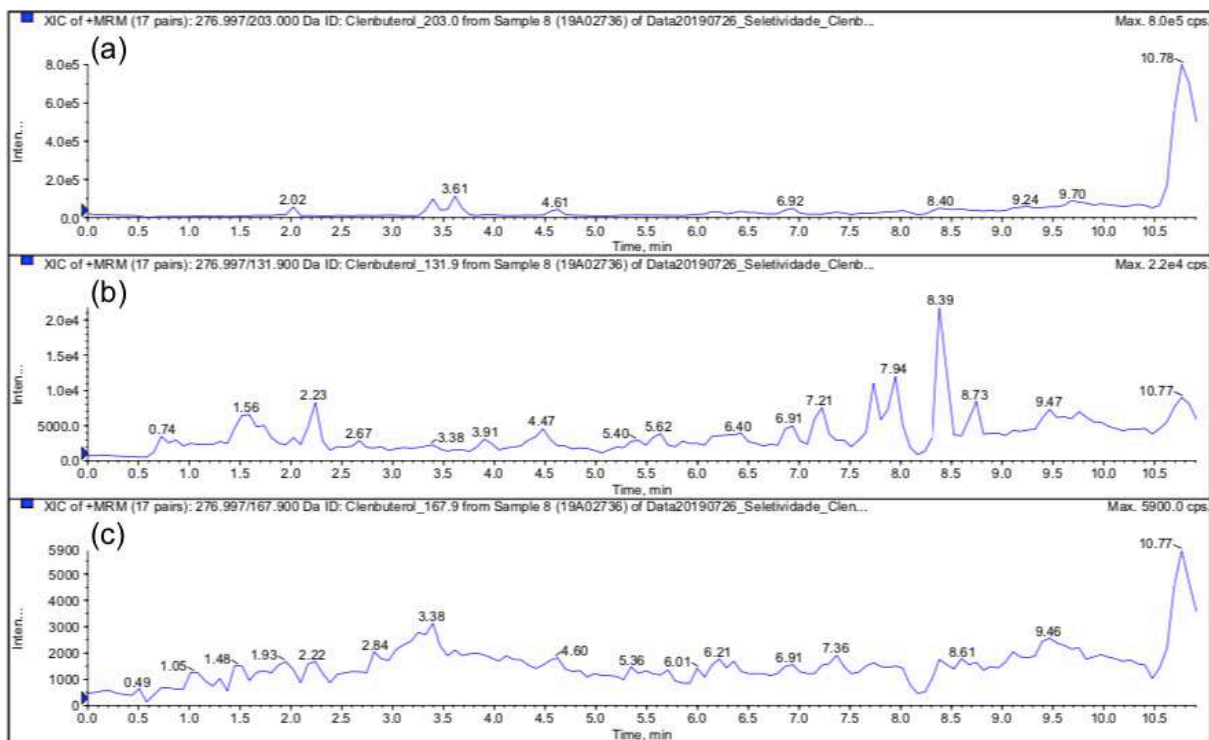
[4] Matriz: Urina – Branco 04.



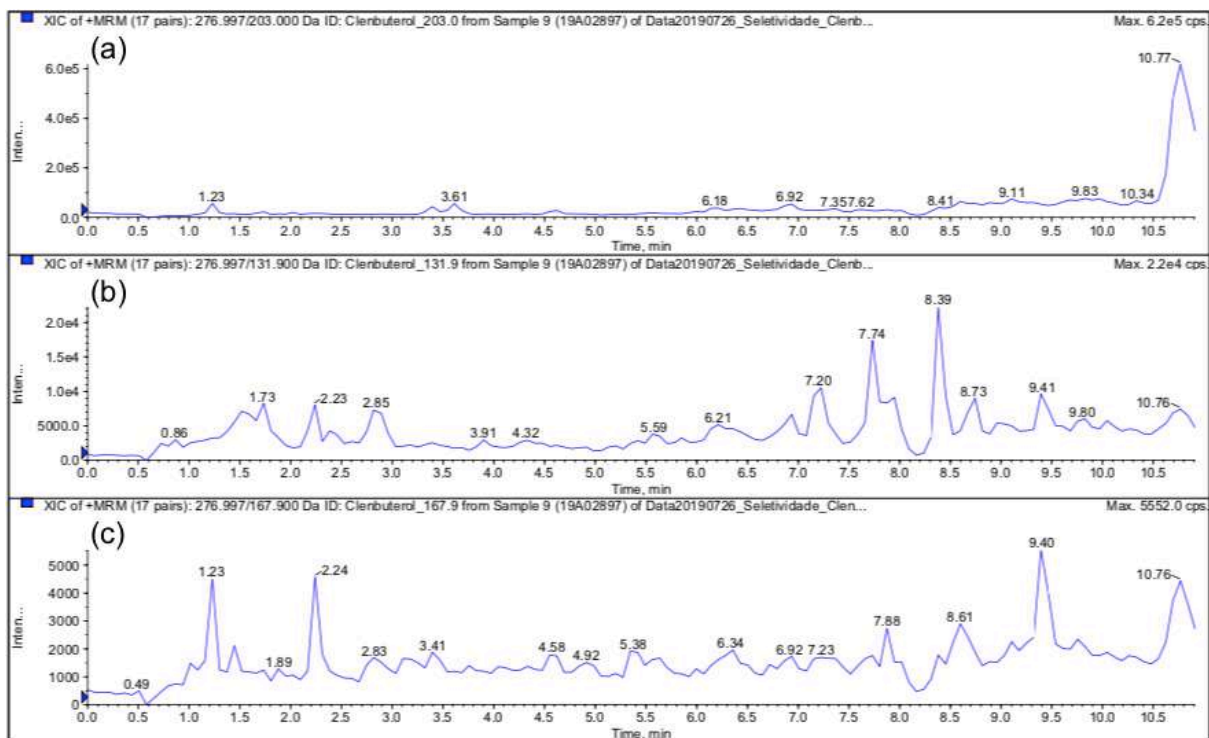
[5] Matriz: Urina – Branco 05.



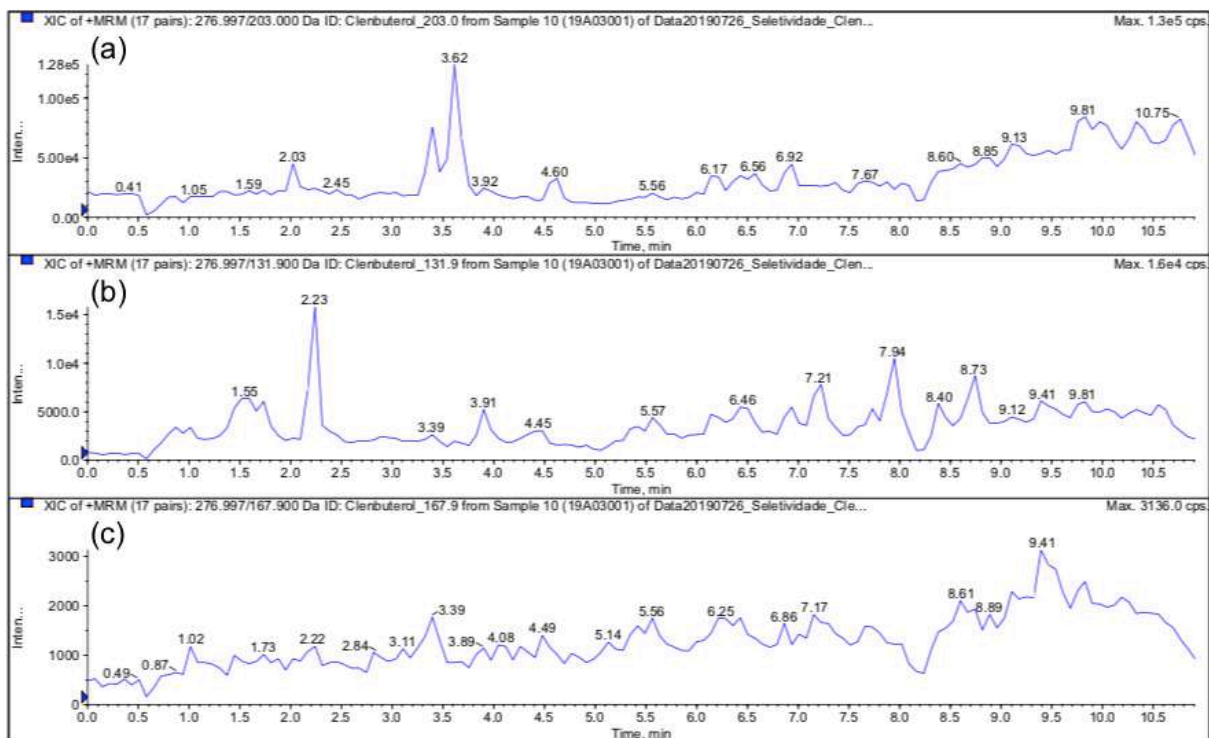
[6] Matriz: Urina – Branco 06.



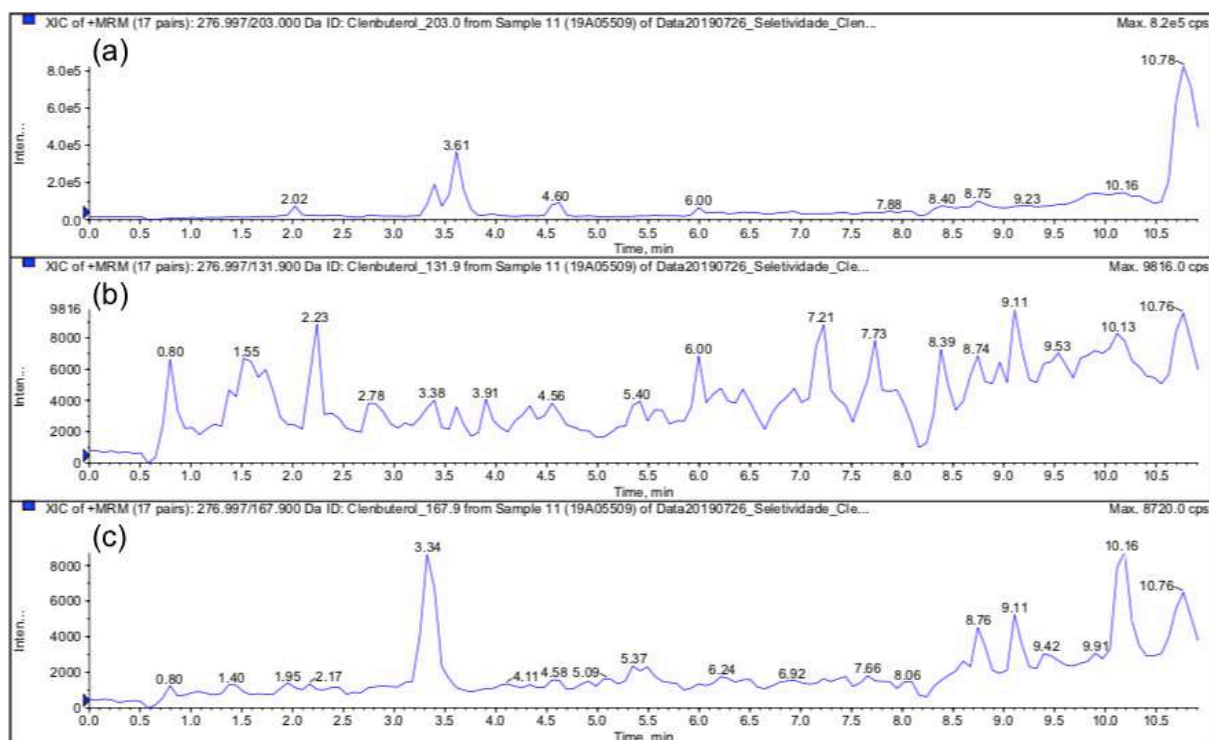
[7] Matriz: Urina – Branco 07.



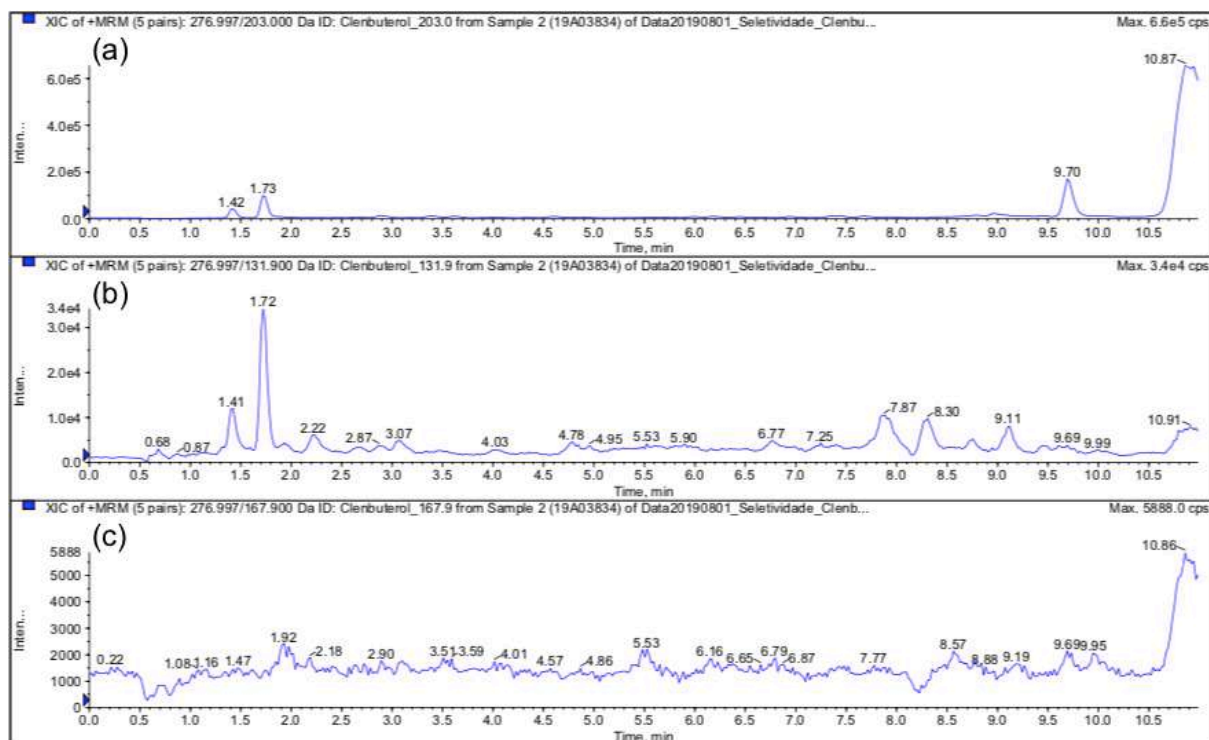
[8] Matriz: Urina – Branco 08.



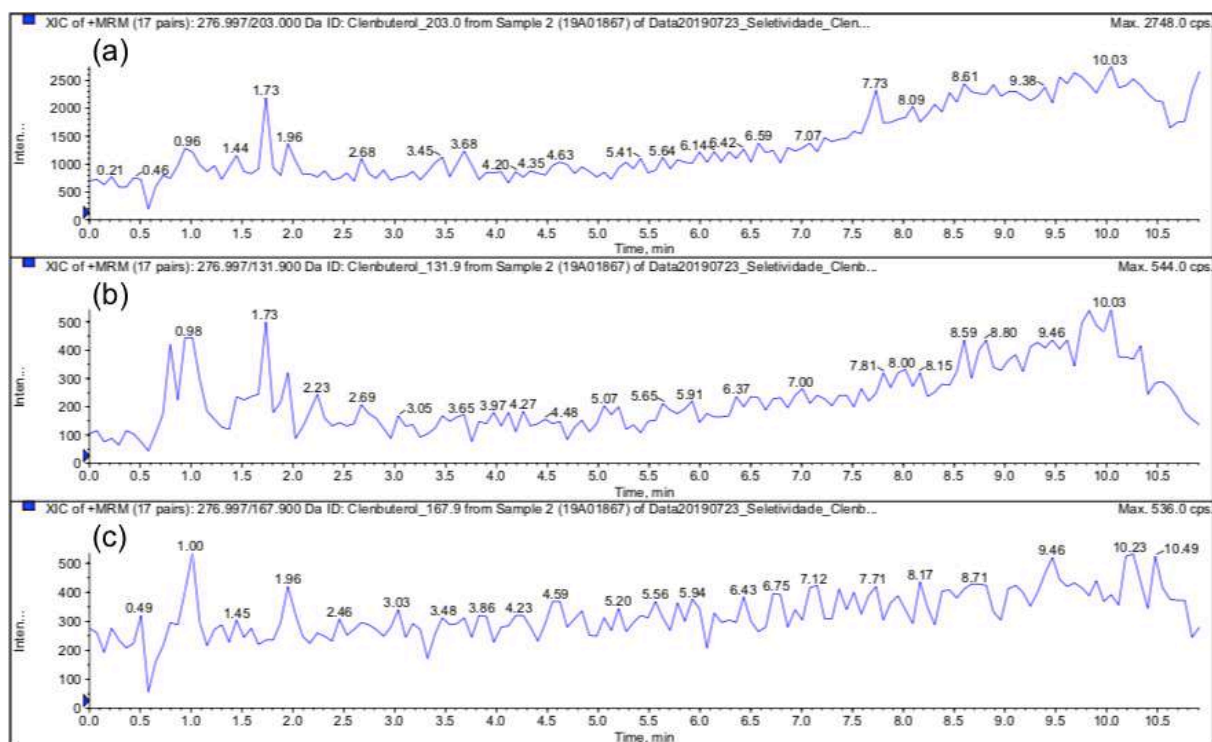
[9] Matriz: Urina – Branco 09.



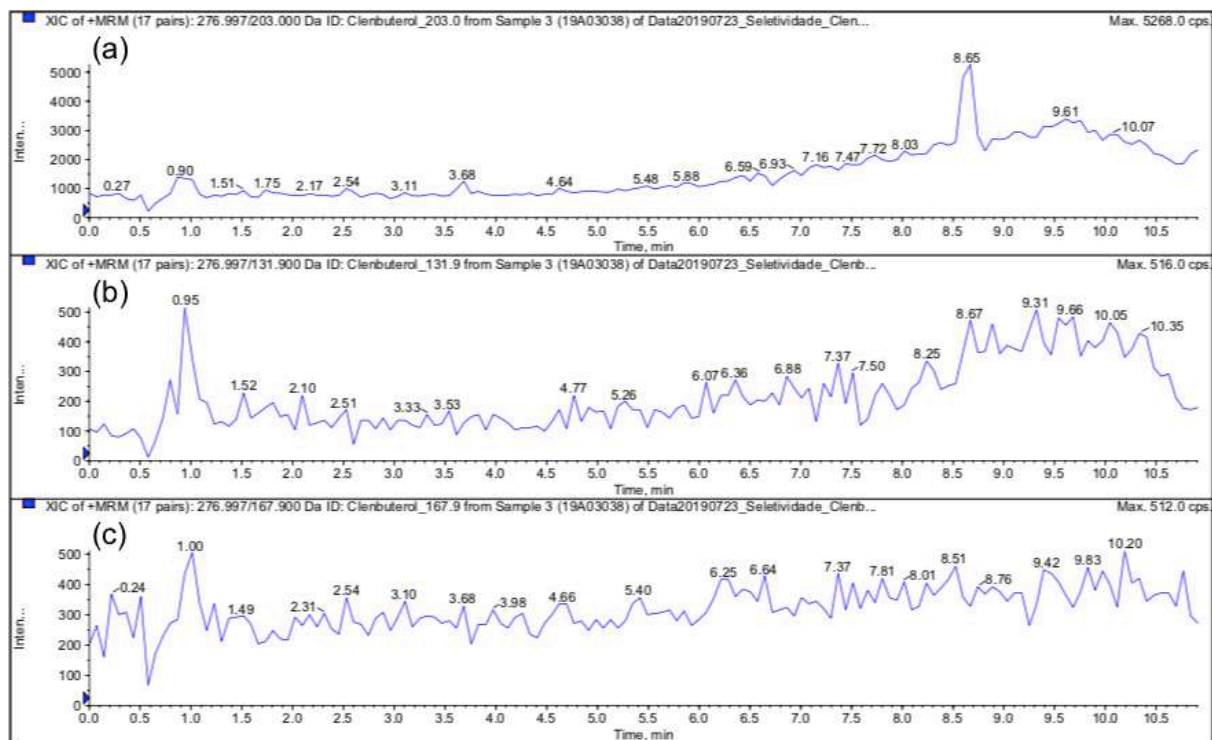
[10] Matriz: Urina – Branco 10.



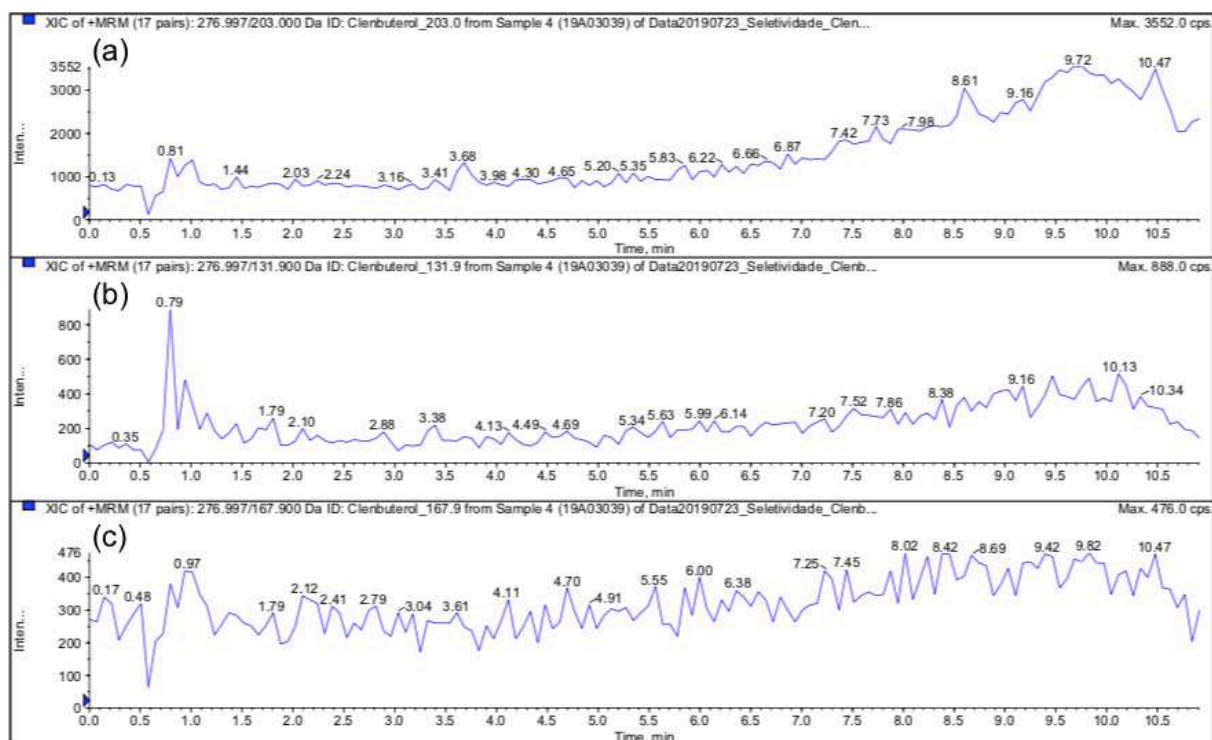
[11] Matriz: Plasma – Branco 01.



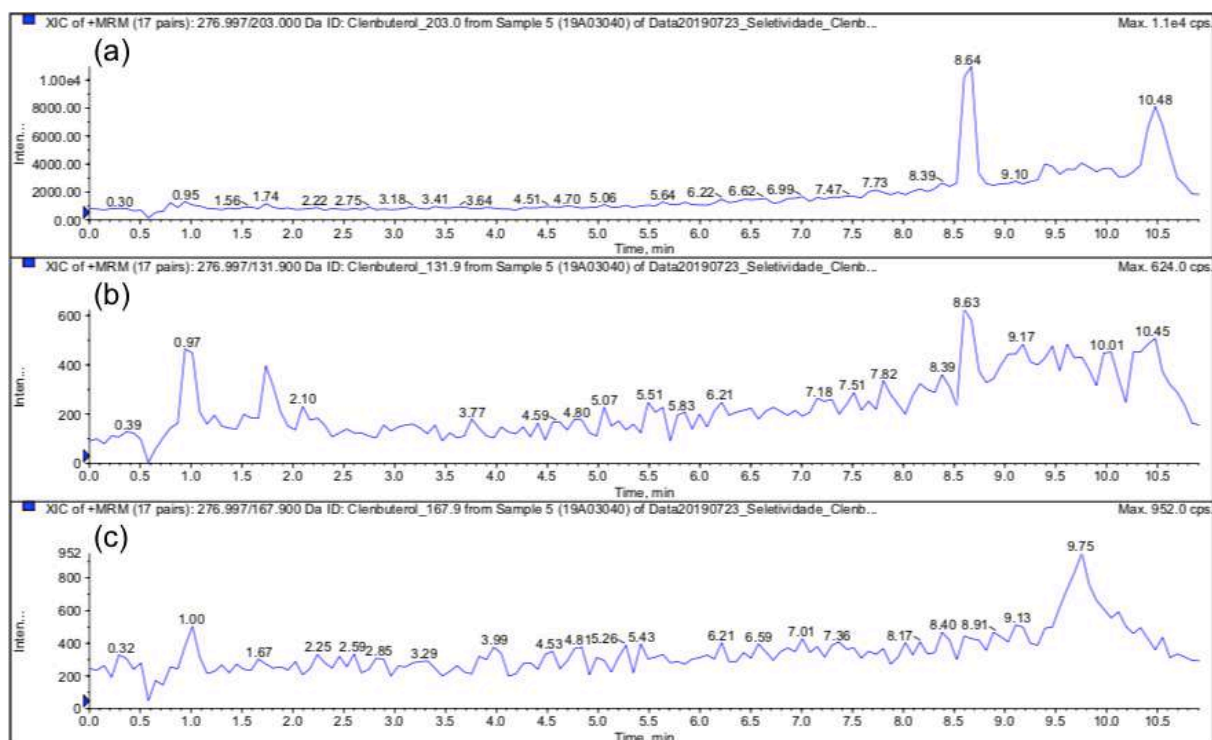
[12] Matriz: Plasma – Branco 02.



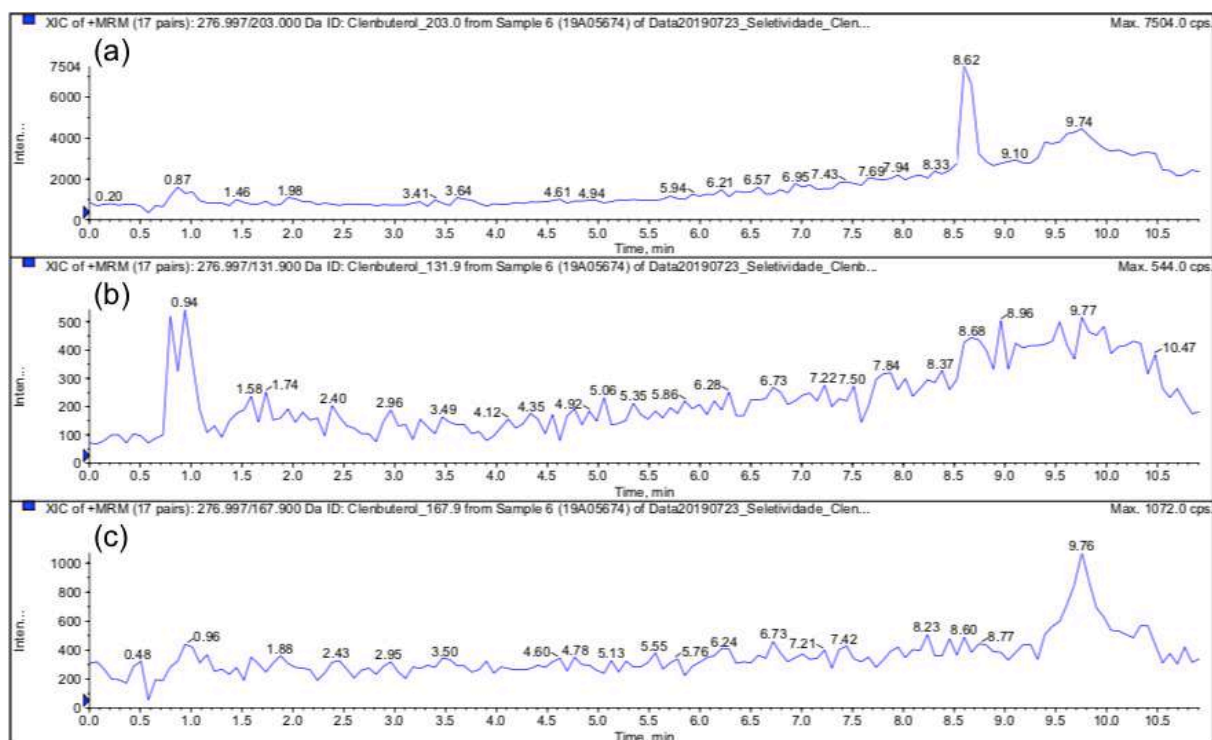
[13] Matriz: Plasma – Branco 03.



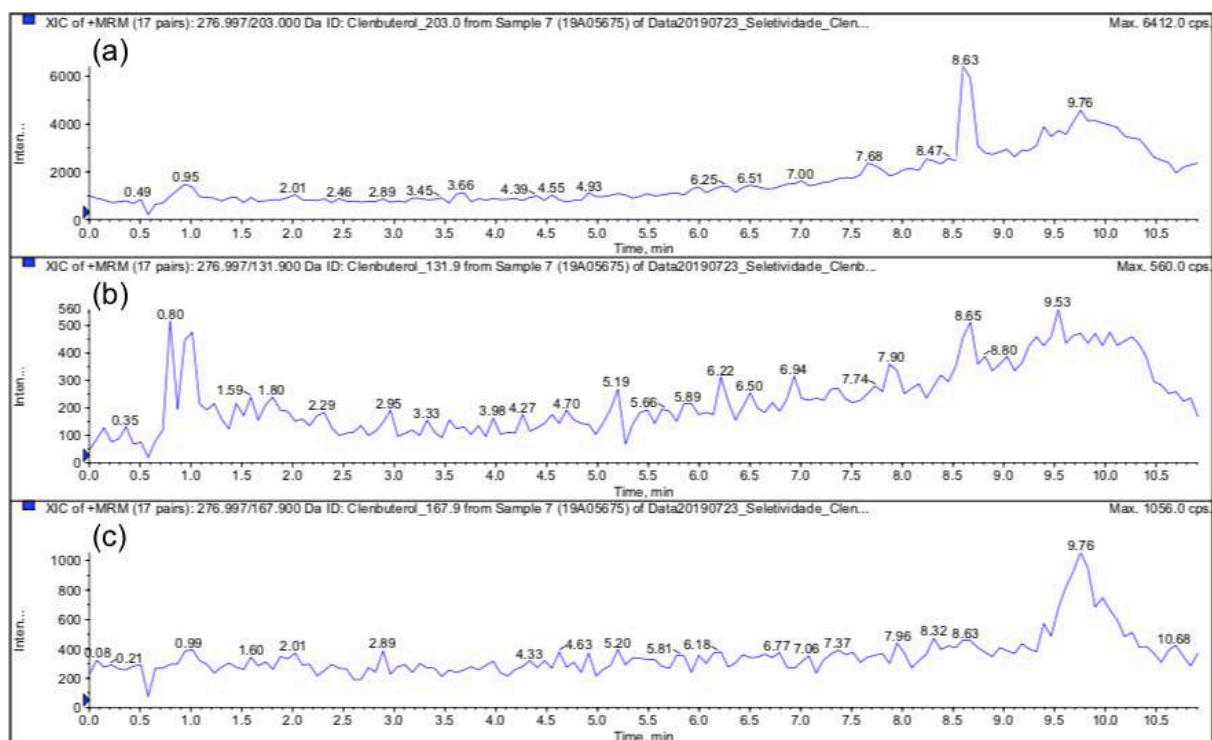
[14] Matriz: Plasma – Branco 04.



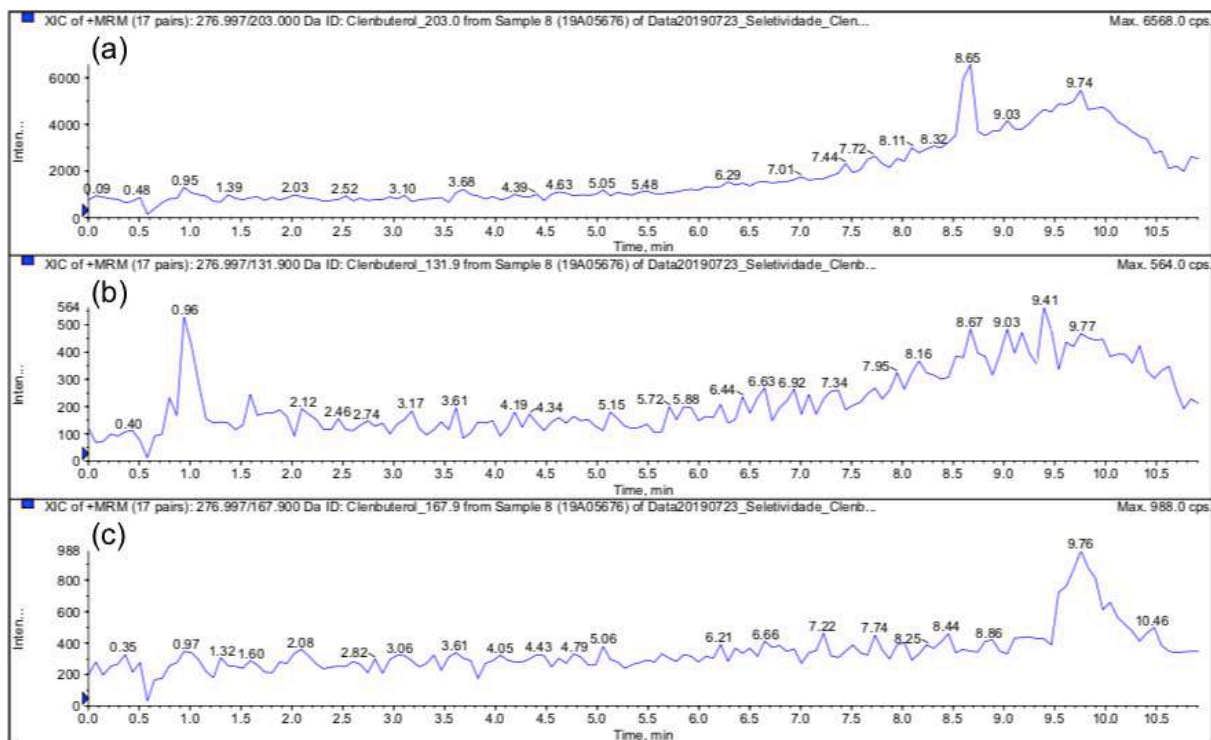
[15] Matriz: Plasma – Branco 05.



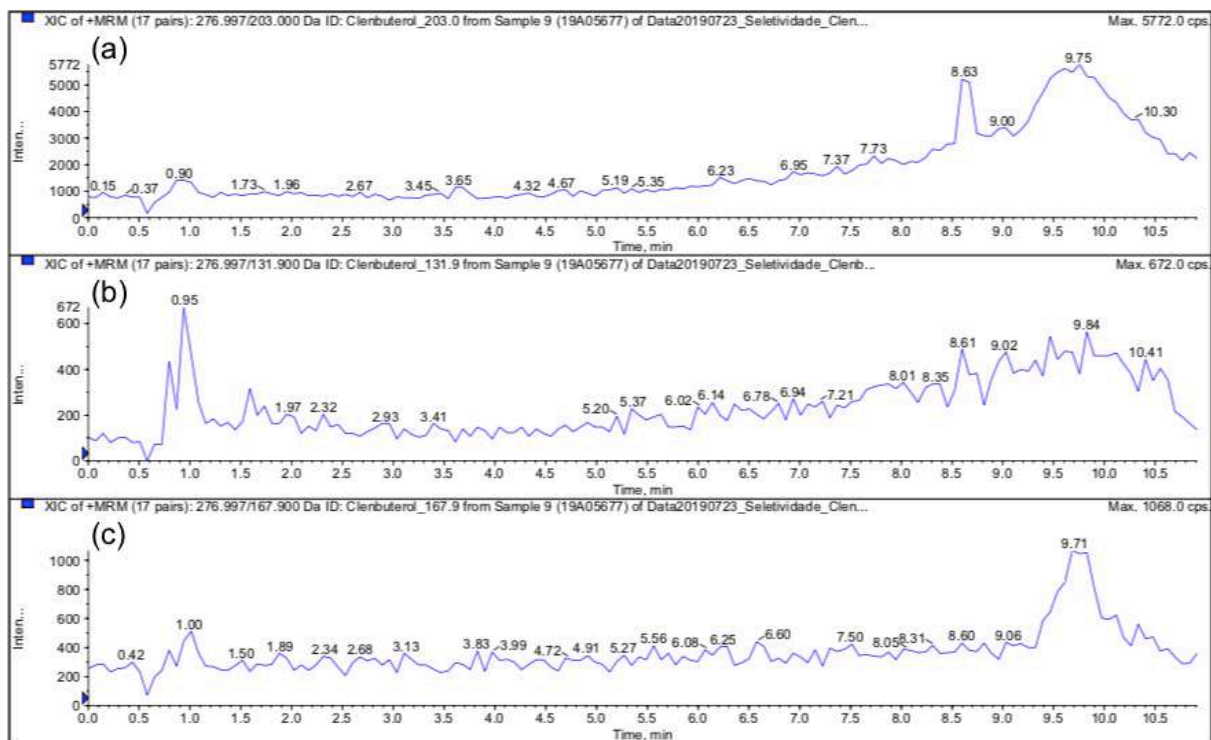
[16] Matriz: Plasma – Branco 06.



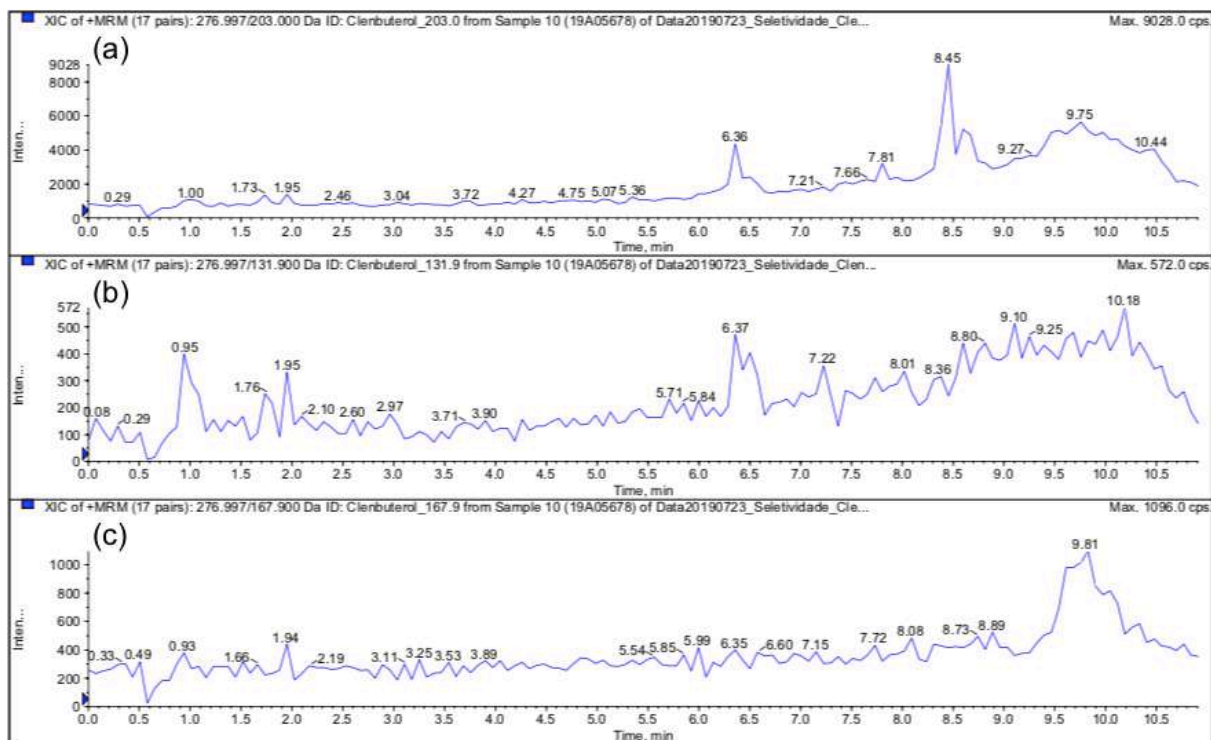
[17] Matriz: Plasma – Branco 07.



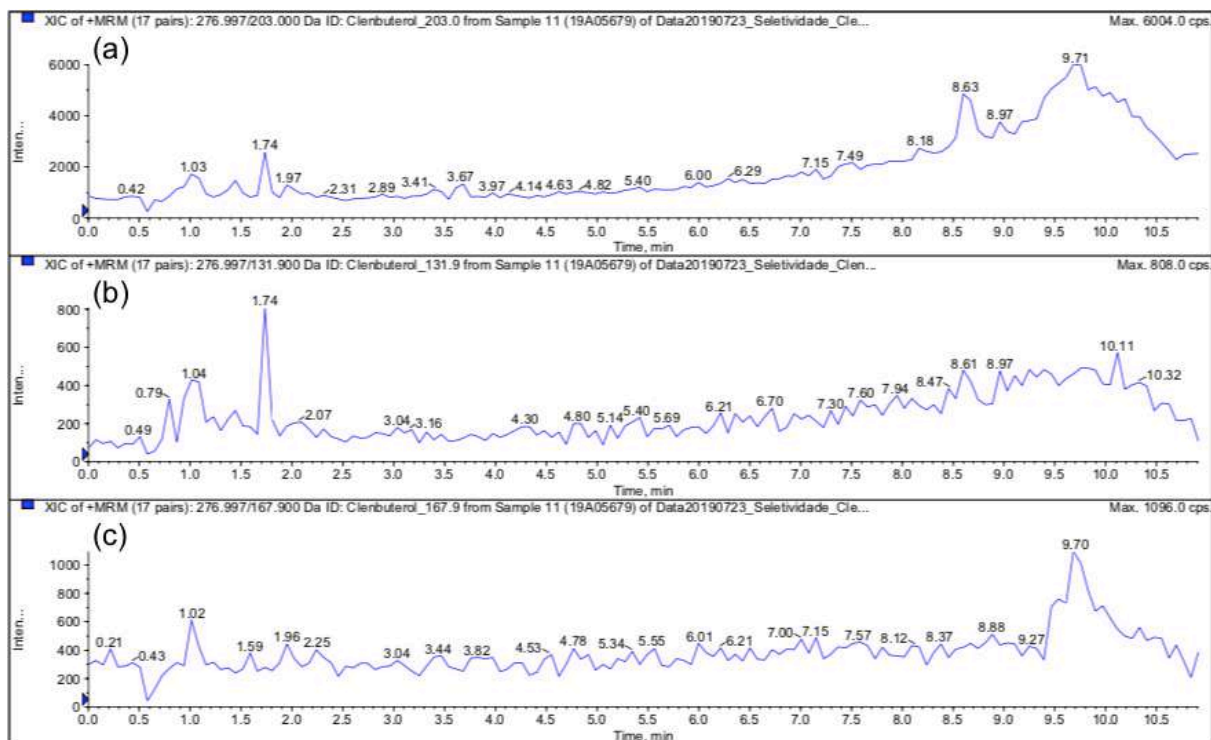
[18] Matriz: Plasma – Branco 08.



[19] Matriz: Plasma – Branco 09.



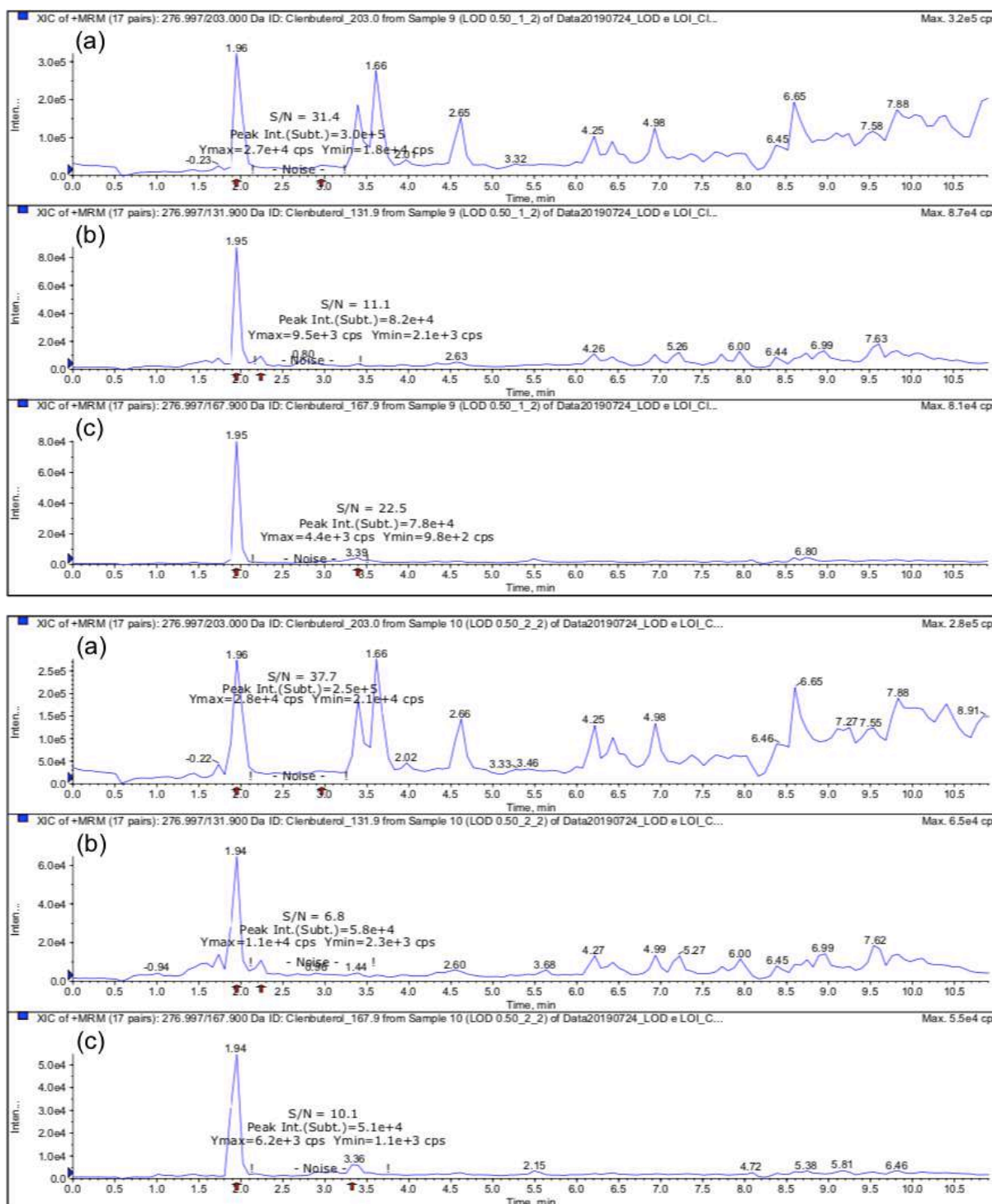
[20] Matriz: Plasma – Branco 10.



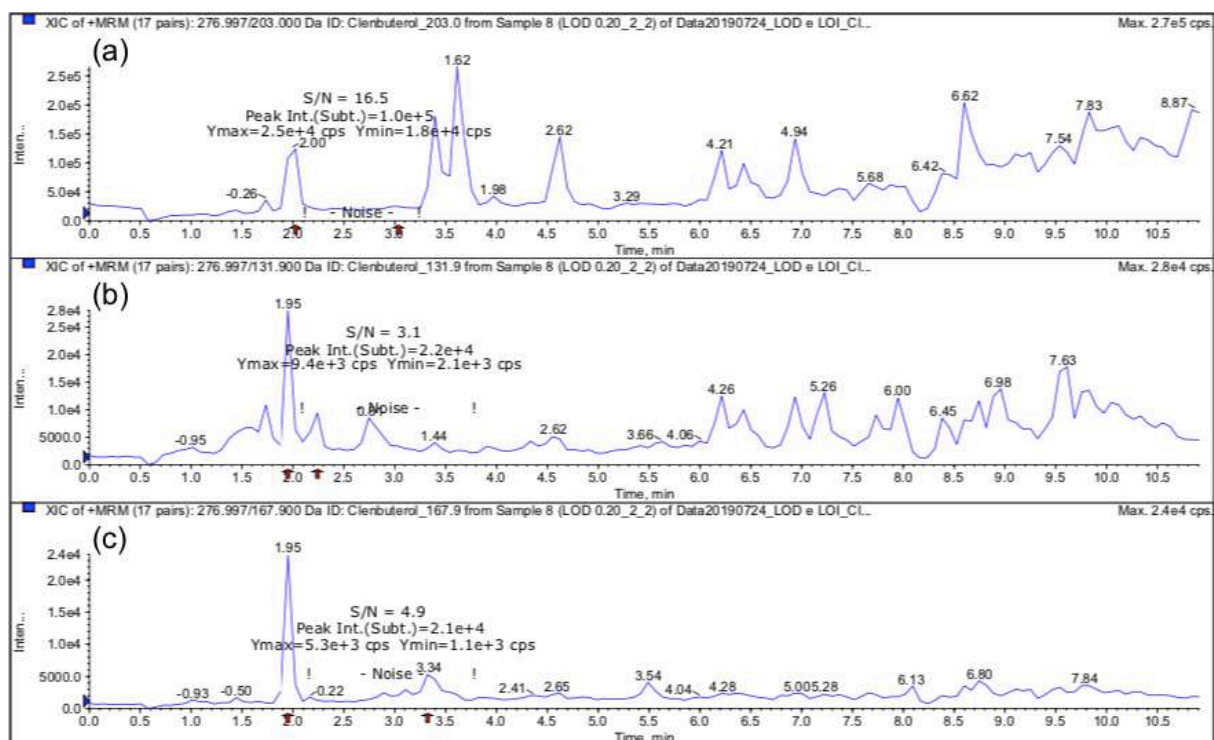
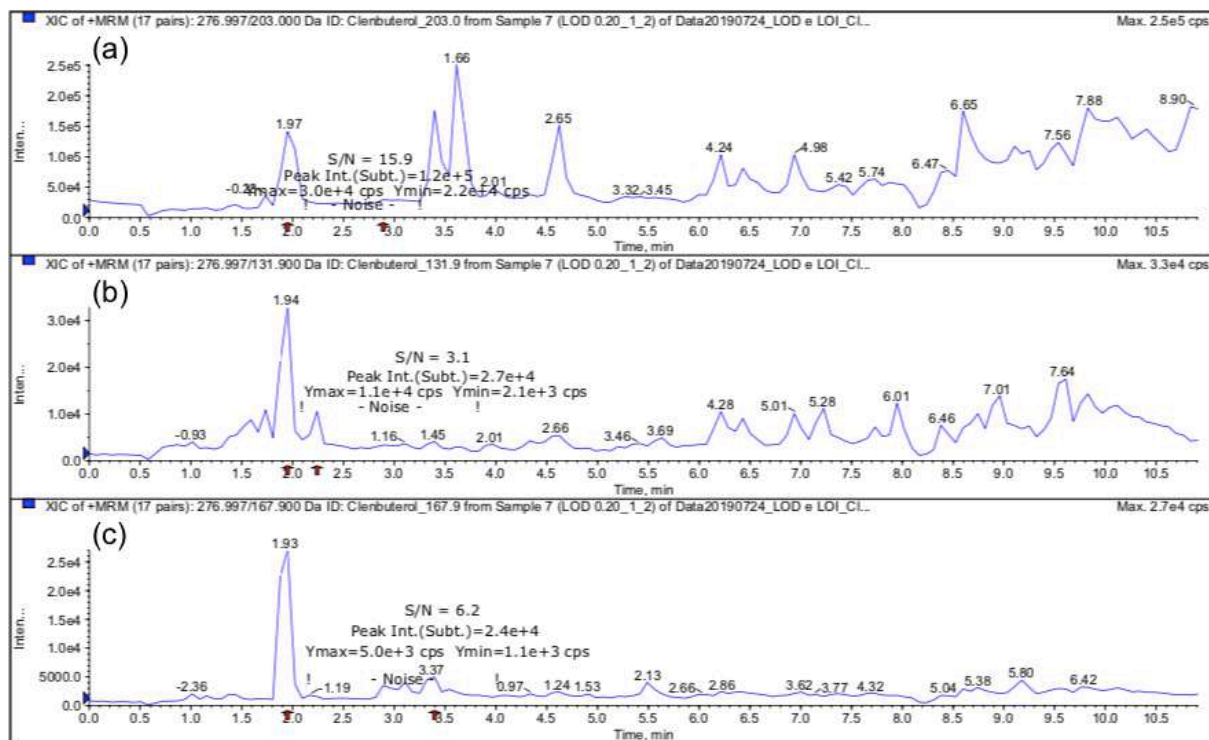
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS PARA O TESTE DO LIMITE DE DETECÇÃO

(a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.

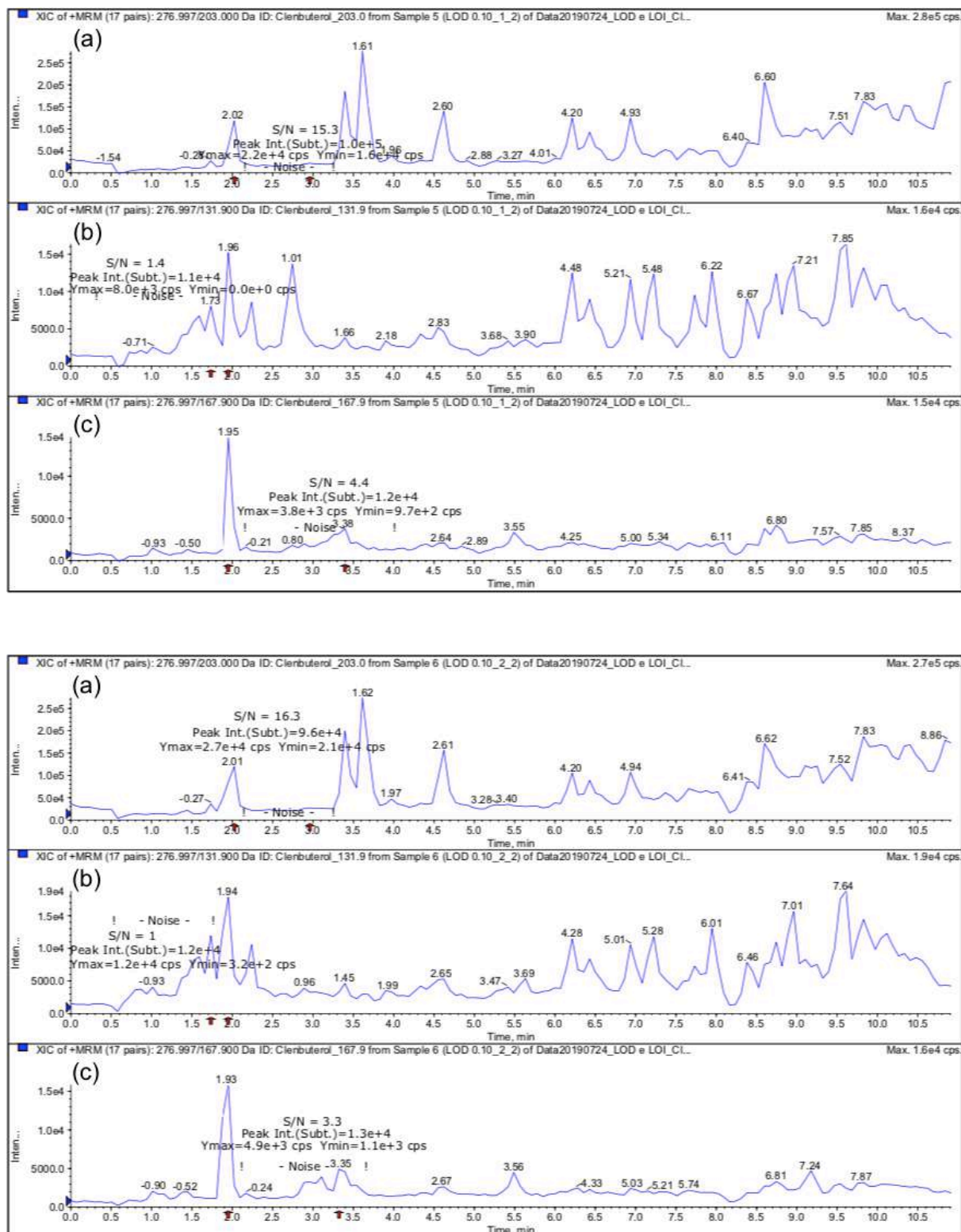
[1] Matriz: Urina – Concentração 0,50 ng/mL (2 amostras).



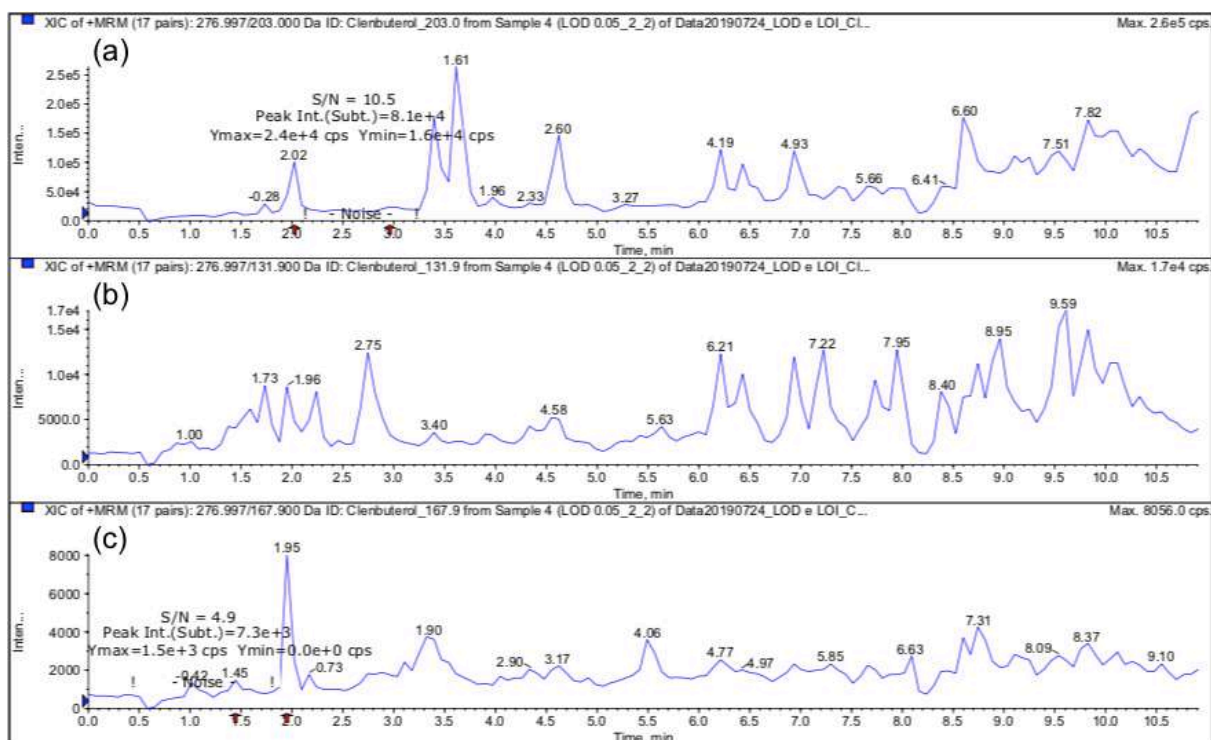
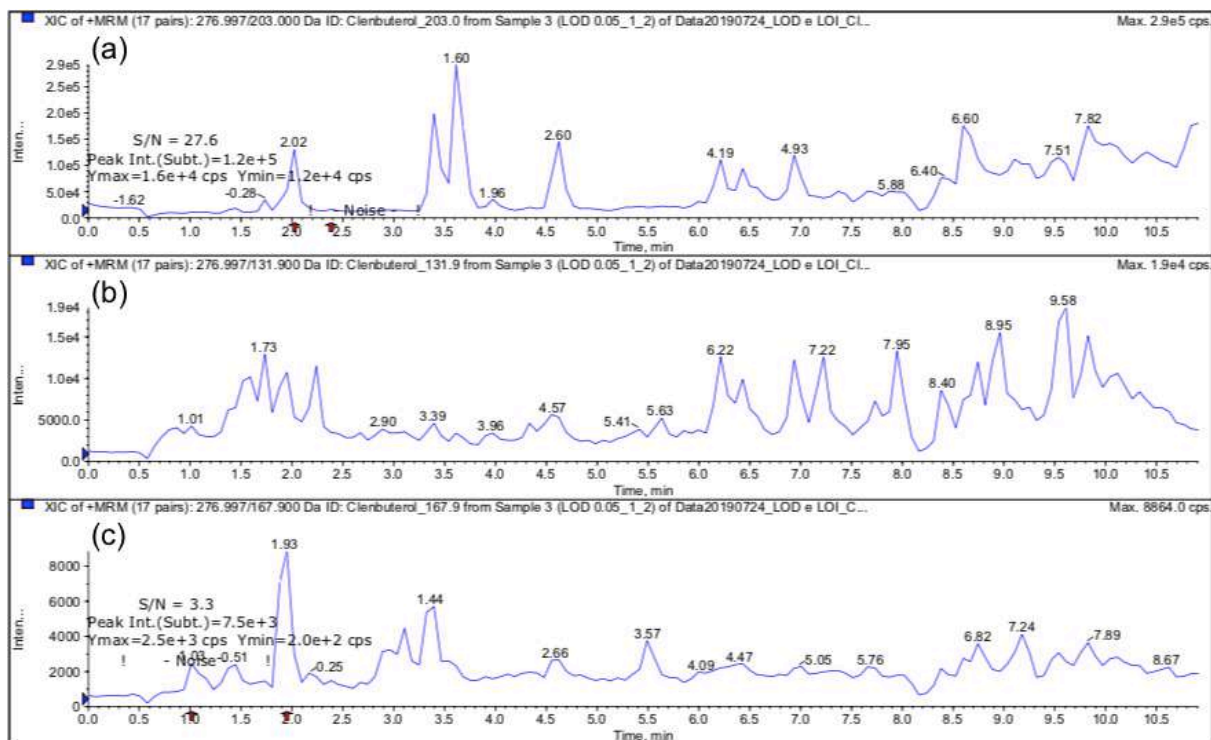
[2] Matriz: Urina – Concentração 0,20 ng/mL (2 amostras).



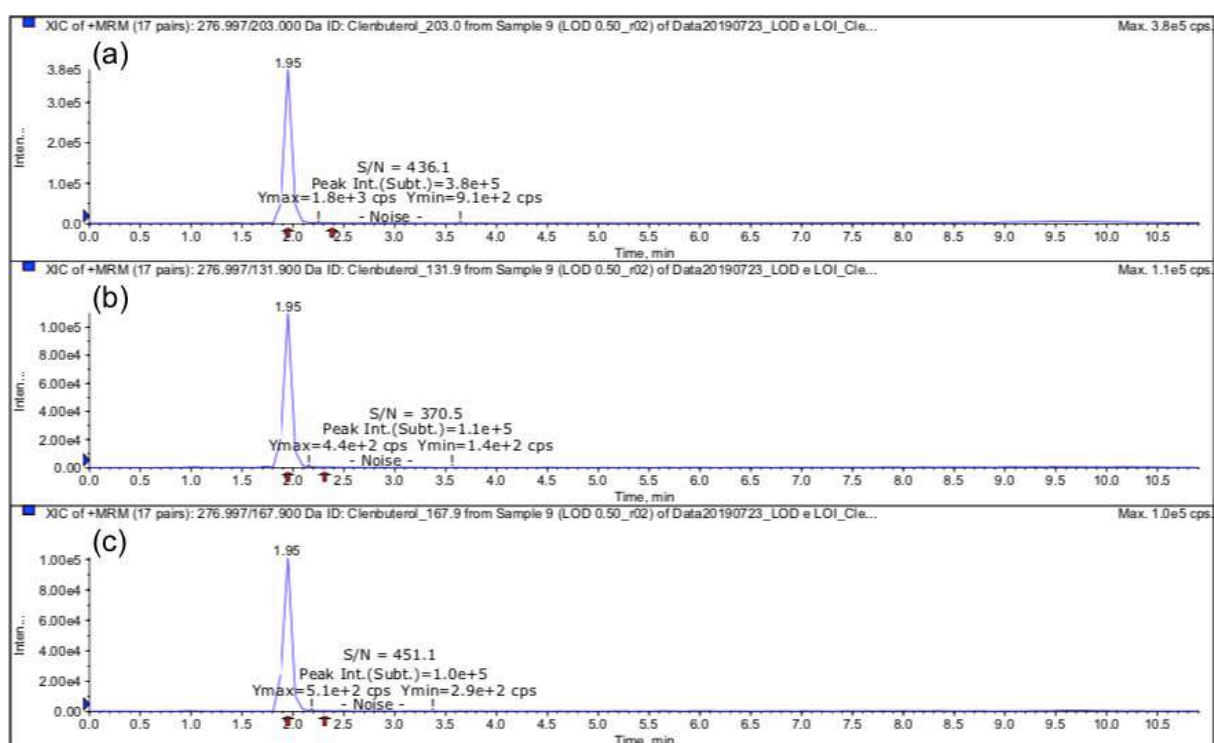
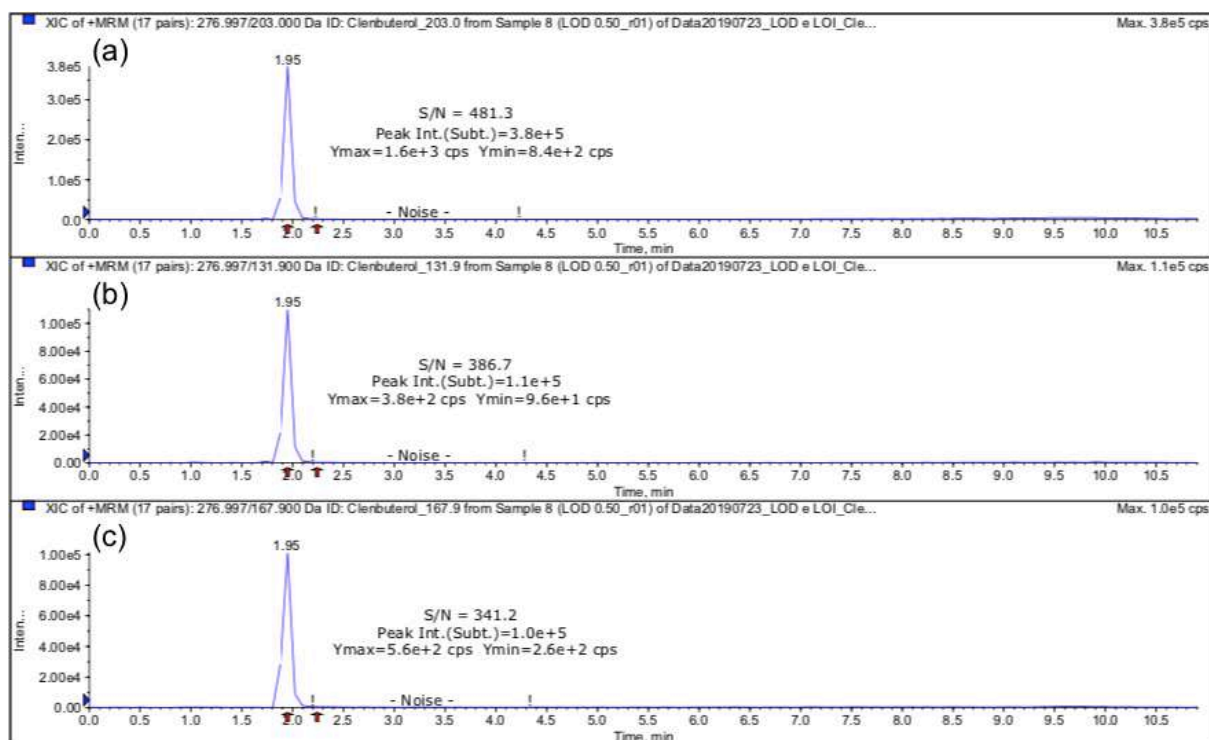
[3] Matriz: Urina – Concentração 0,10 ng/mL (2 amostras).



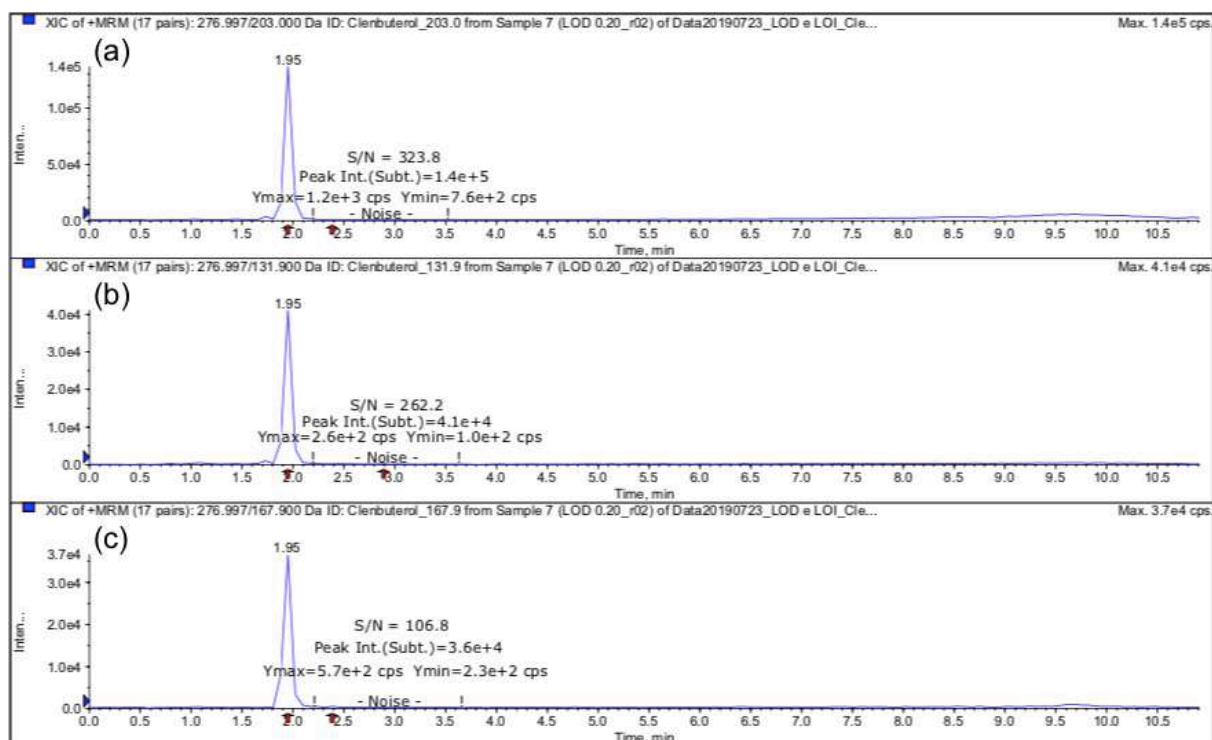
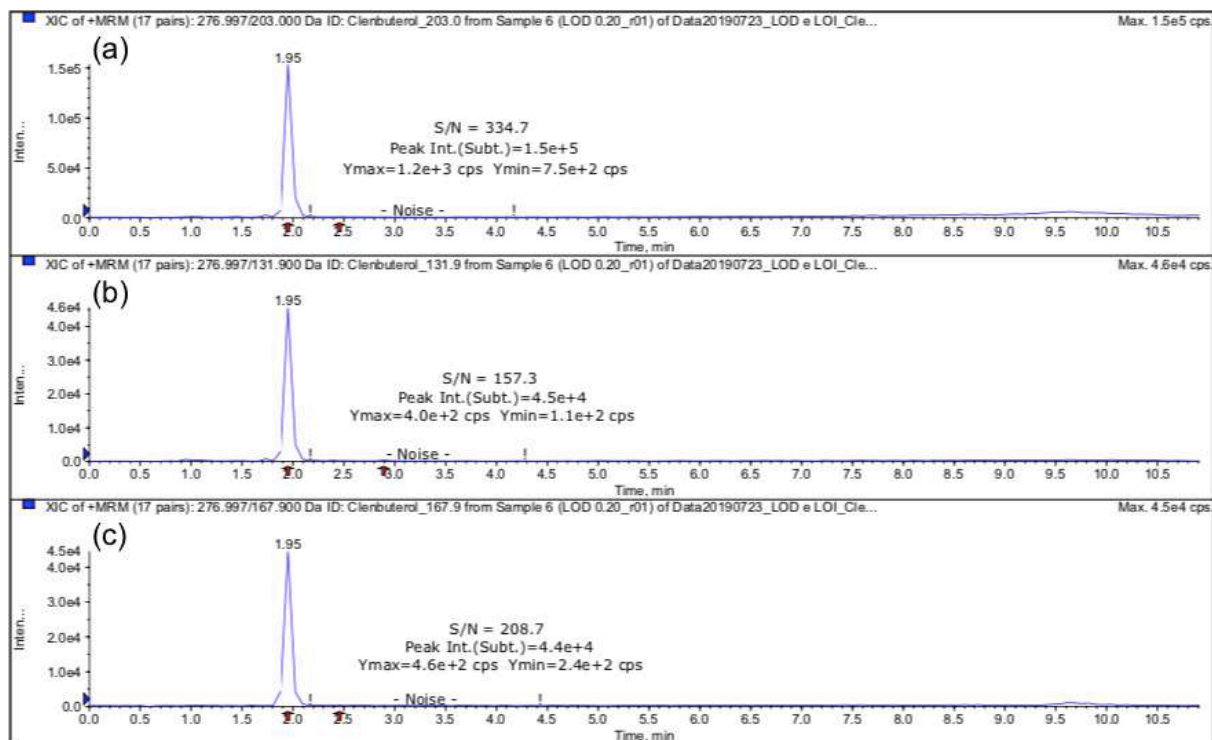
[4] Matriz: Urina – Concentração 0,05 ng/mL (2 amostras).



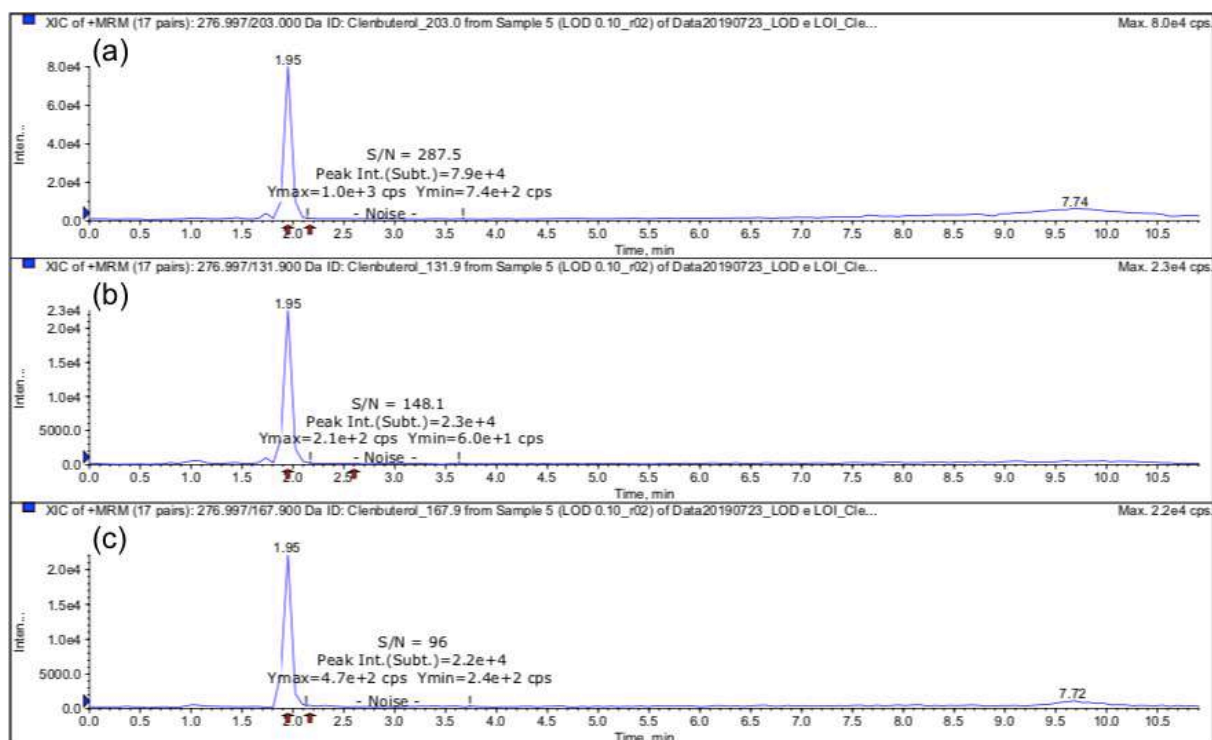
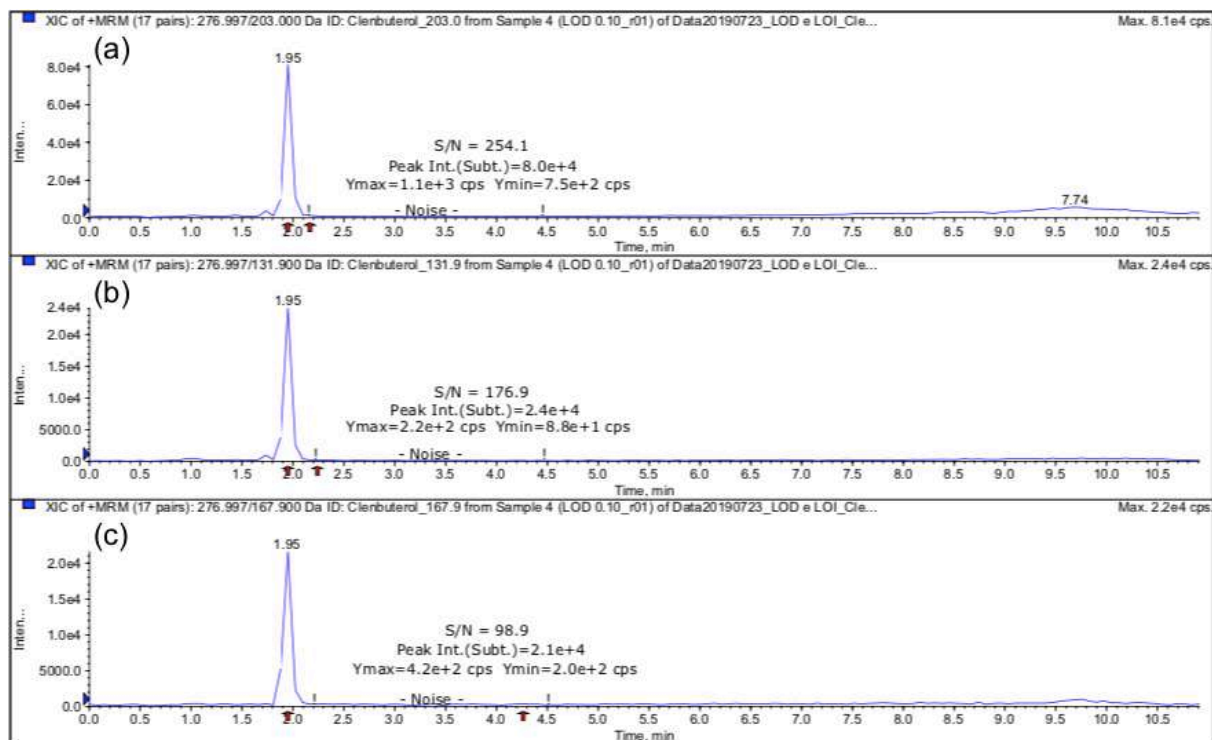
[5] Matriz: Plasma – Concentração 0,50 ng/mL (2 amostras).



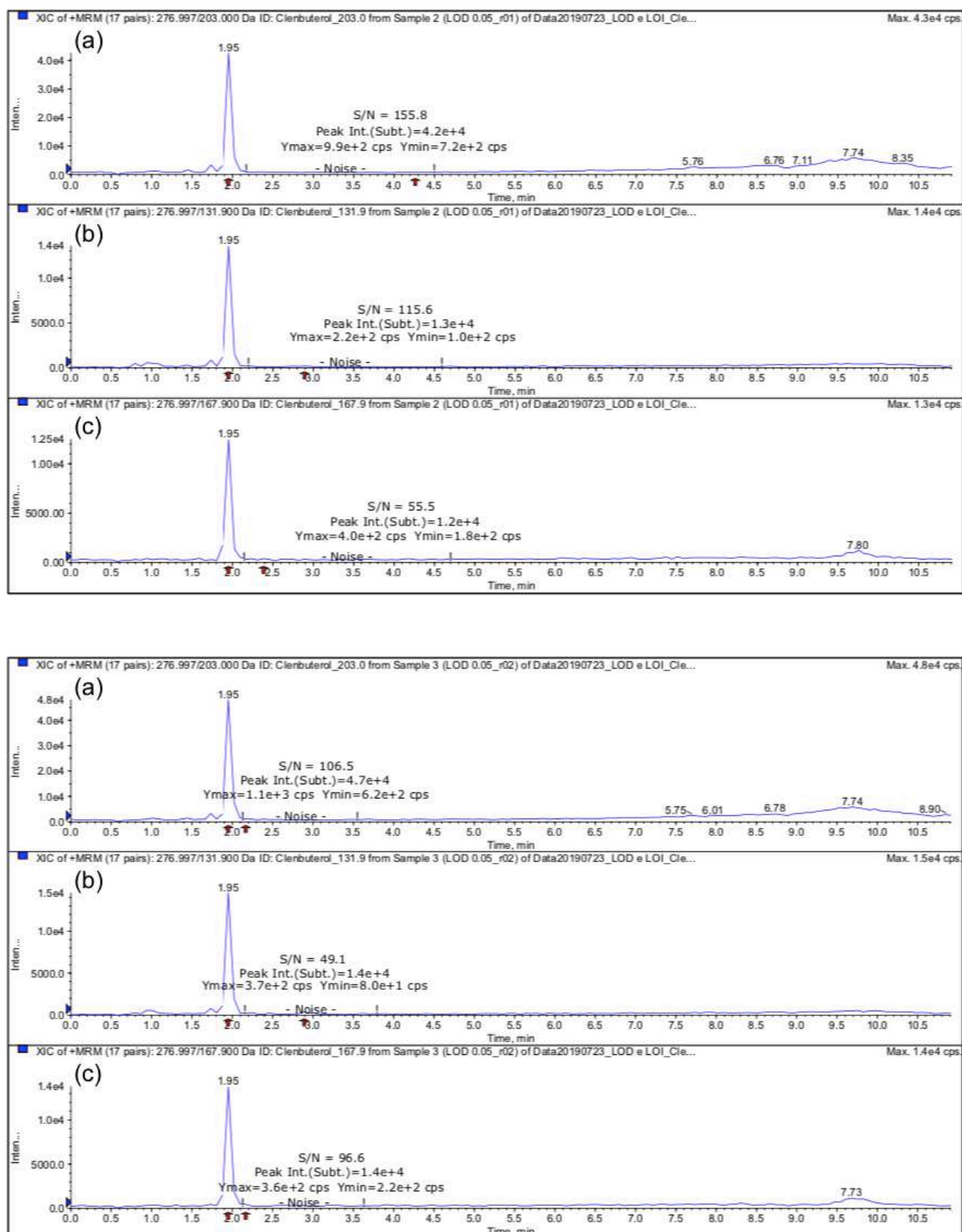
[6] Matriz: Plasma – Concentração 0,20 ng/mL (2 amostras).



[7] Matriz: Plasma – Concentração 0,10 ng/mL (2 amostras).



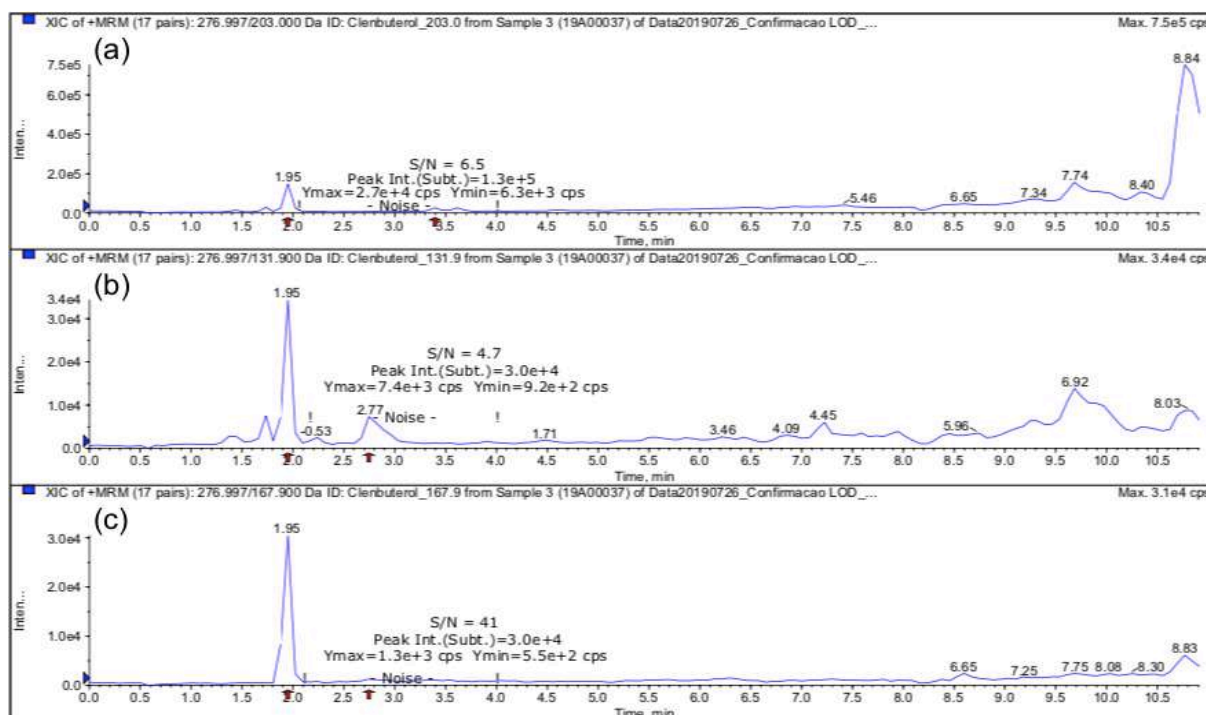
[8] Matriz: Plasma – Concentração 0,05 ng/mL (2 amostras).



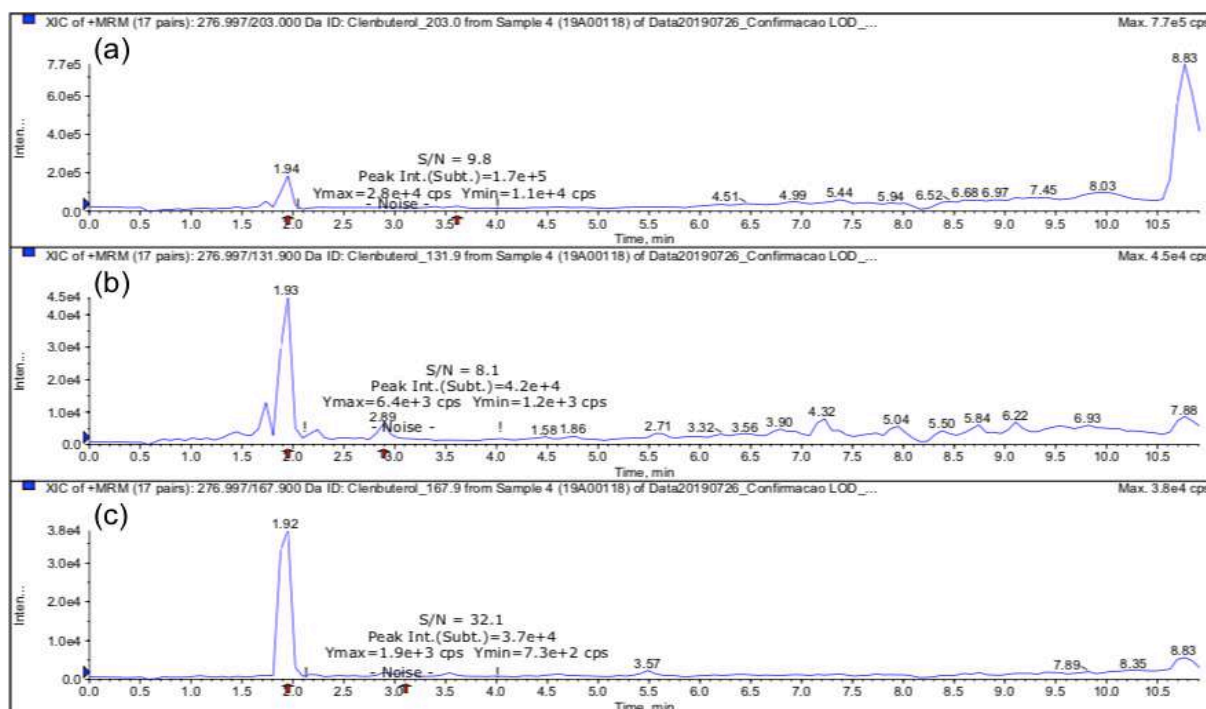
APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS PARA A CONFIRMAÇÃO DO LD

(a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol; (b) fragmento 131,9 Da do clenbuterol; (c) fragmento 167,9 Da do clenbuterol.

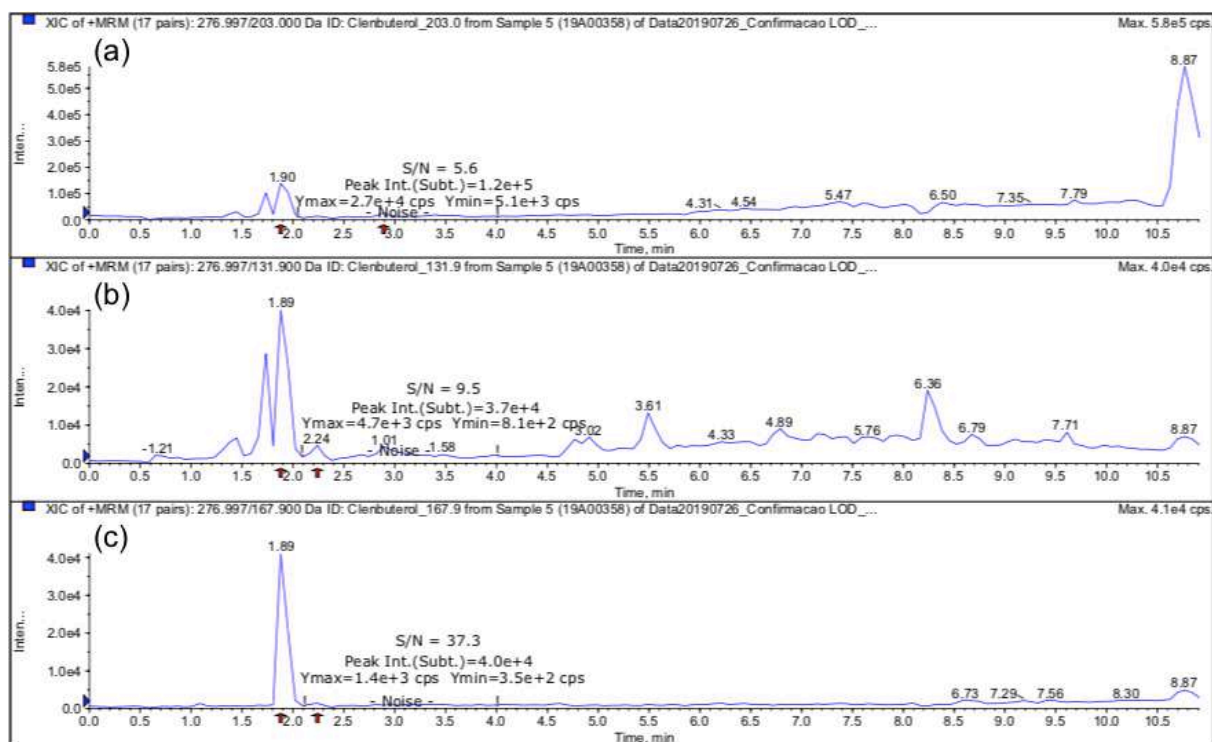
[1] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 01.



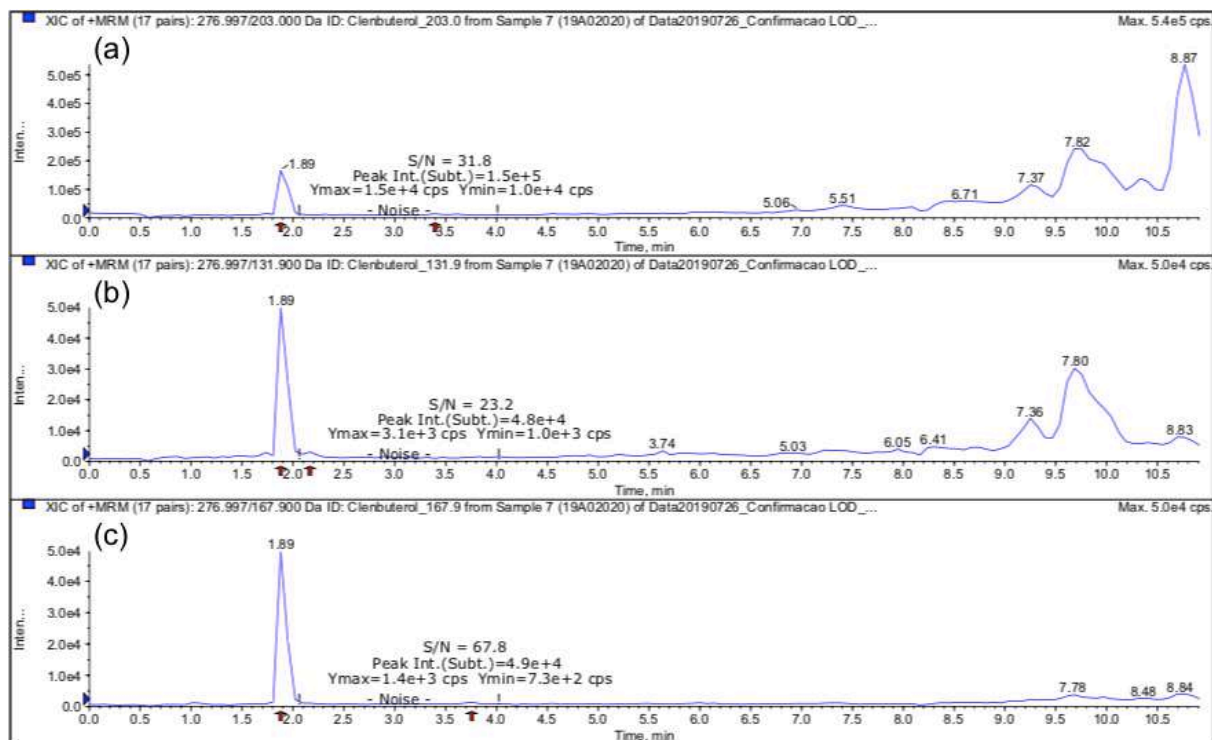
[2] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 02.



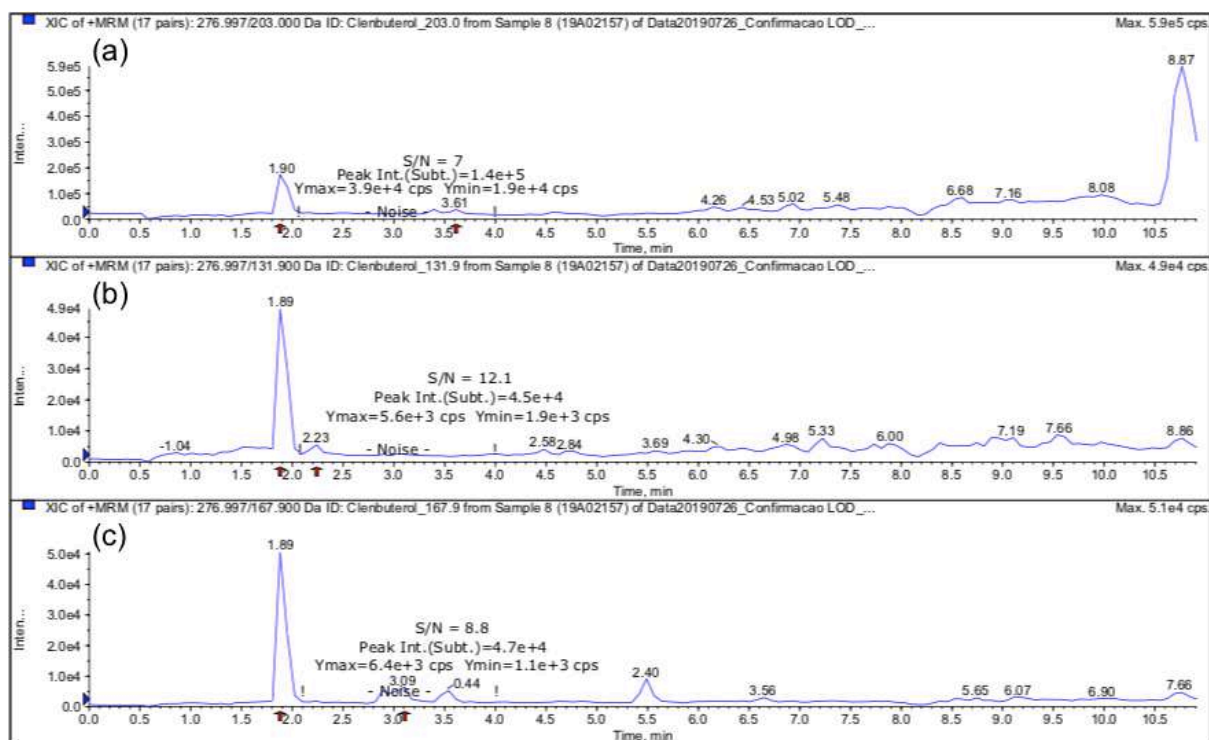
[3] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 03.



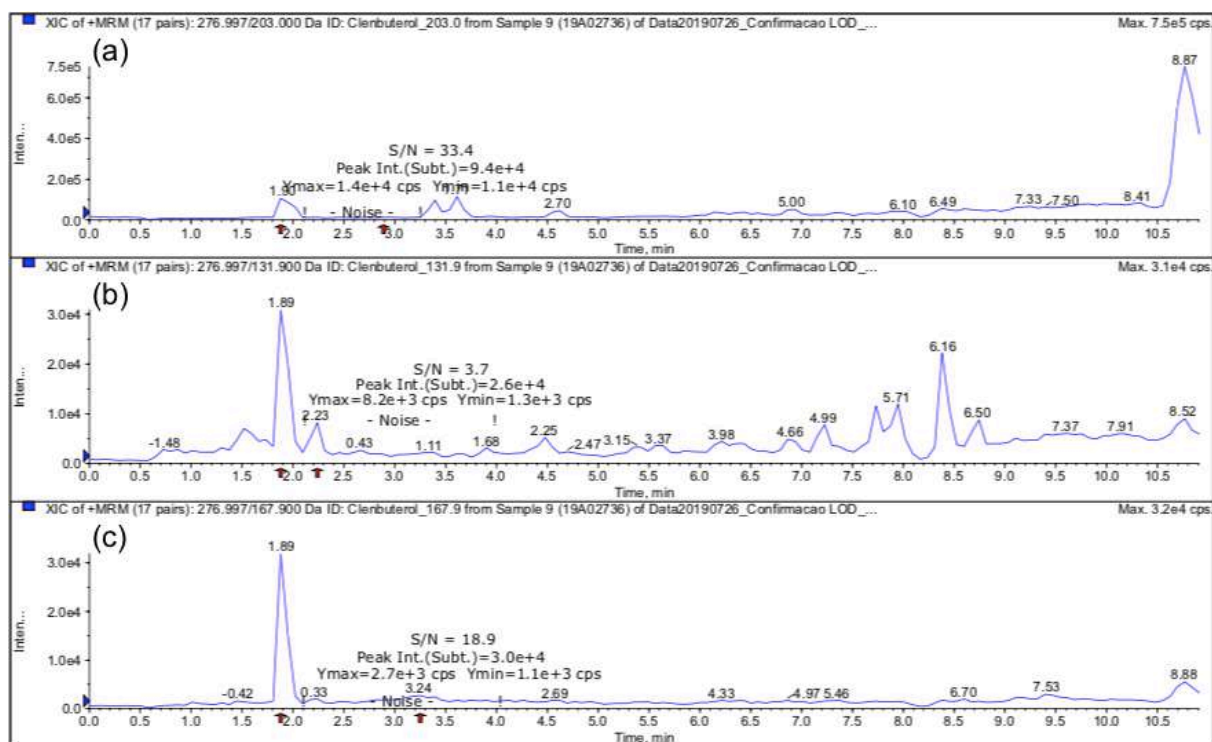
[4] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 04.



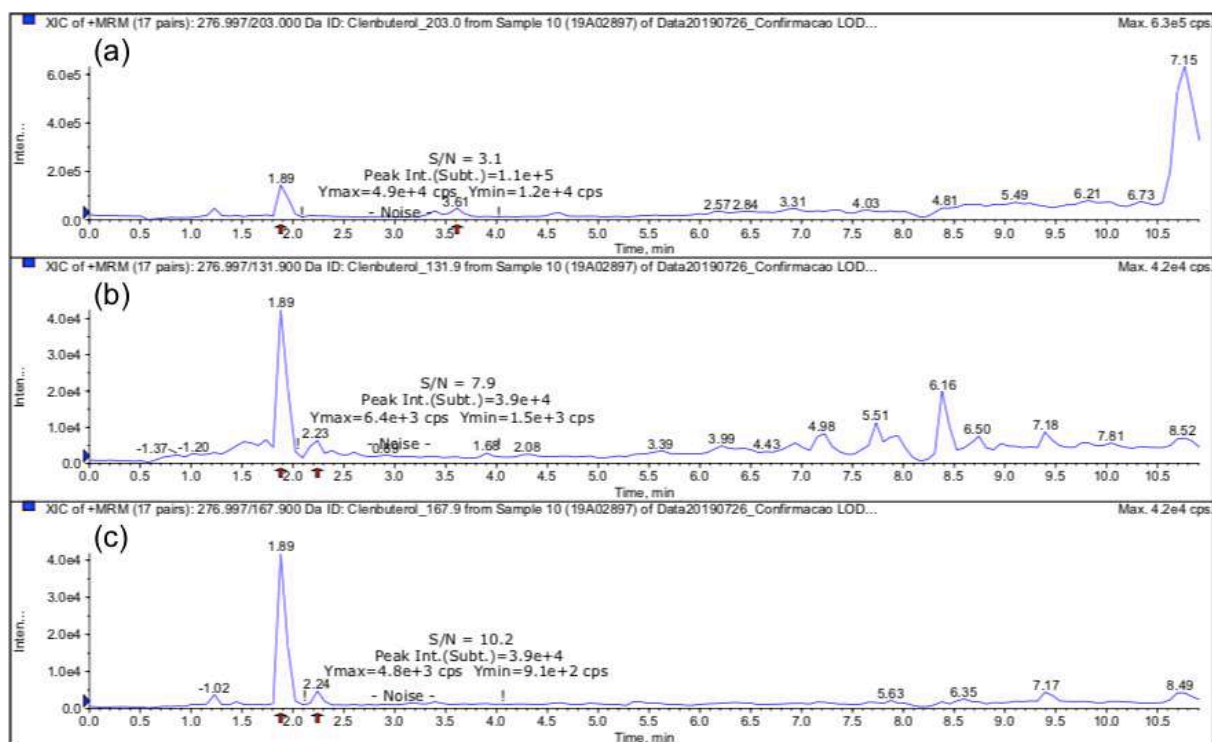
[5] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 05.



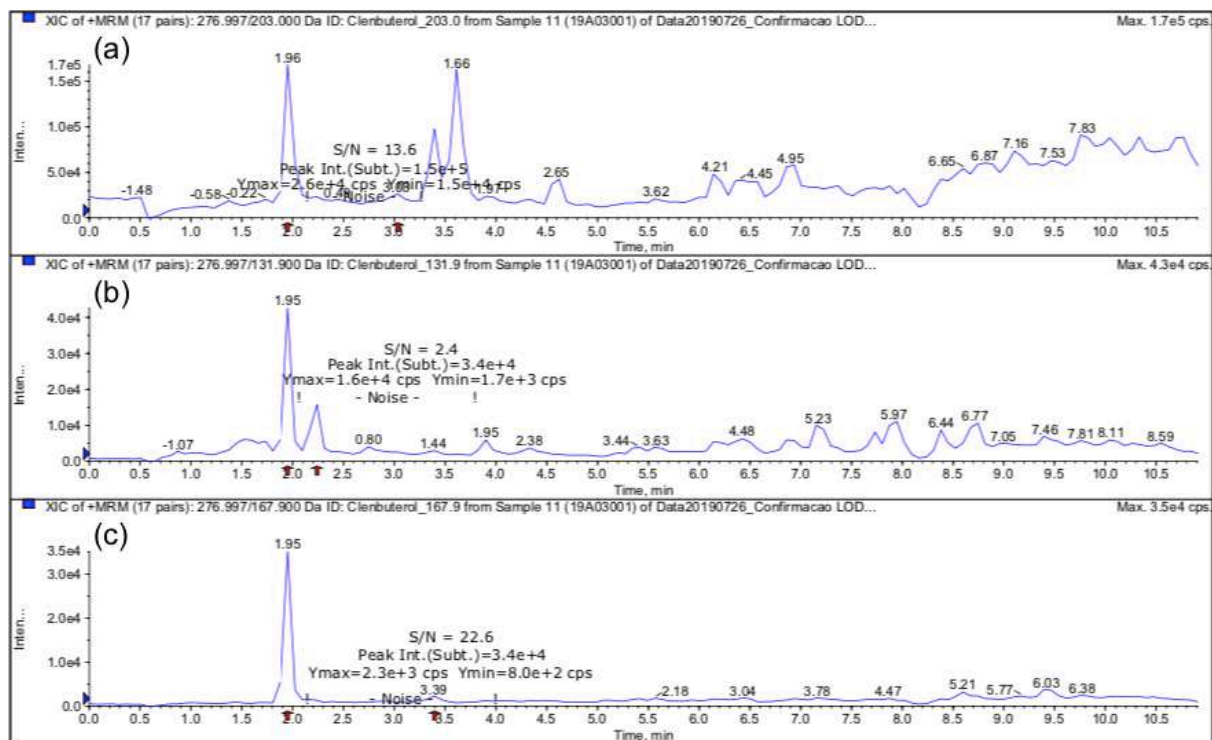
[6] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 06.



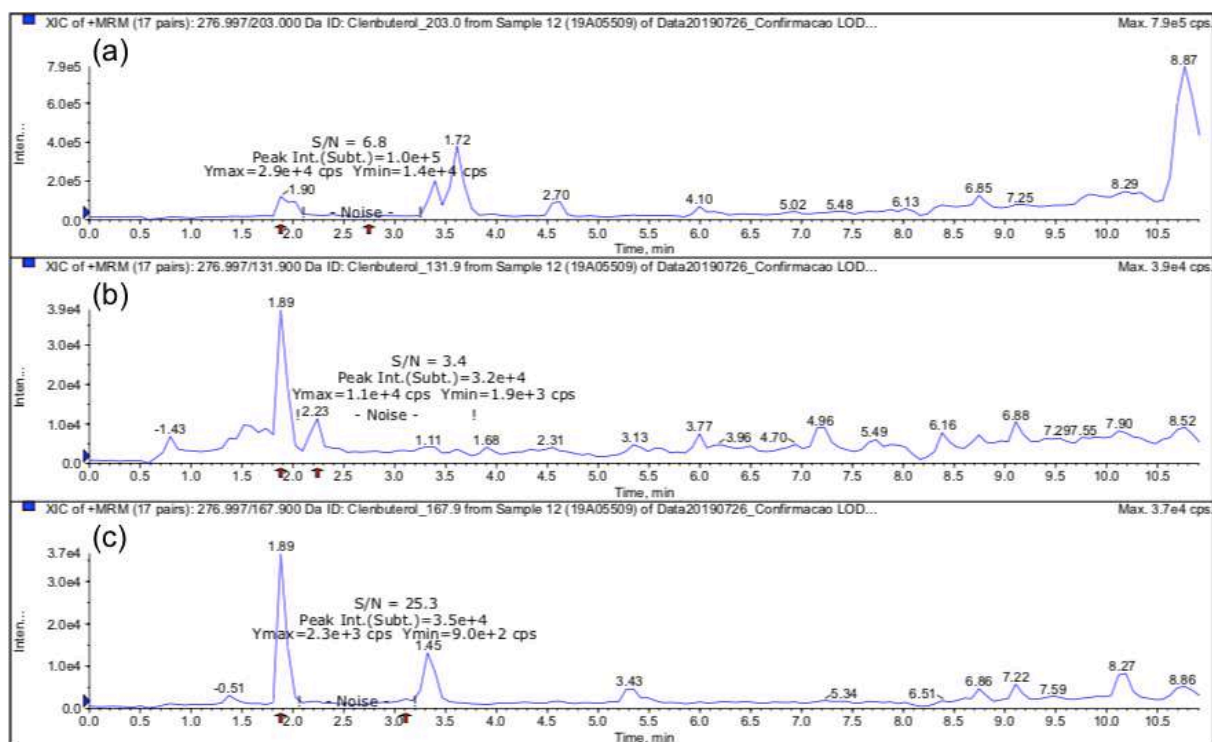
[7] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 07.



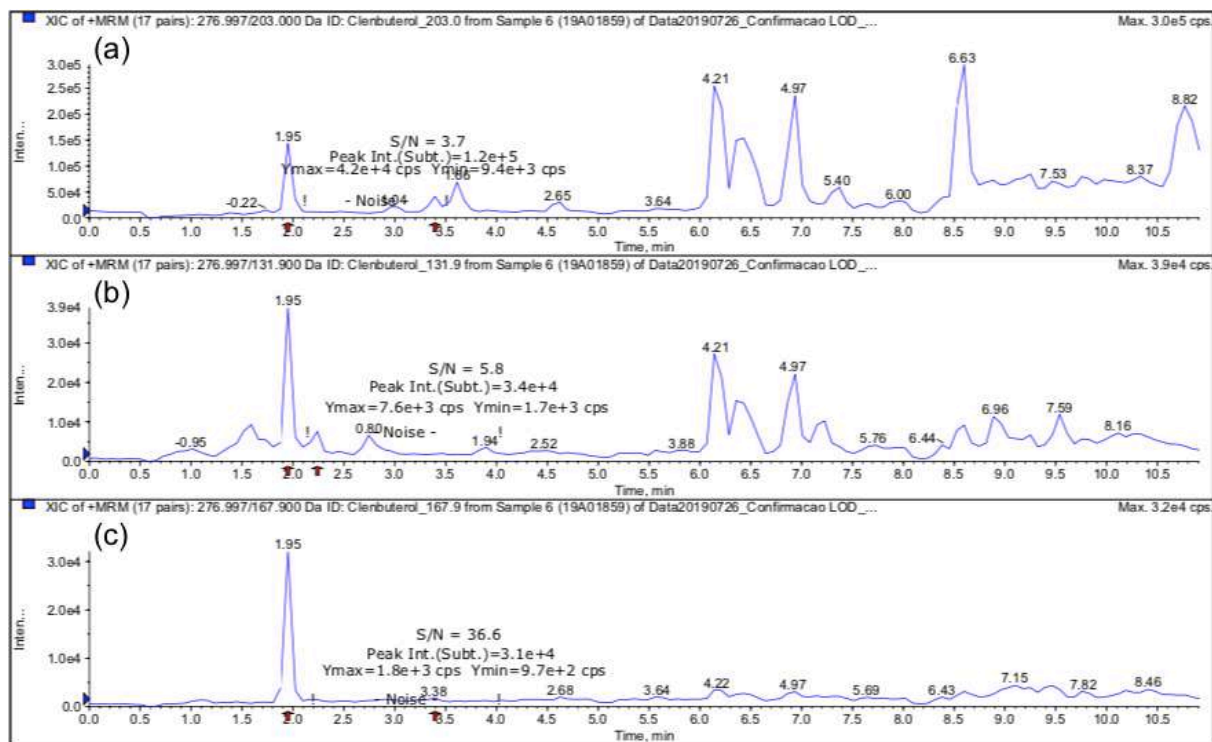
[8] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 08.



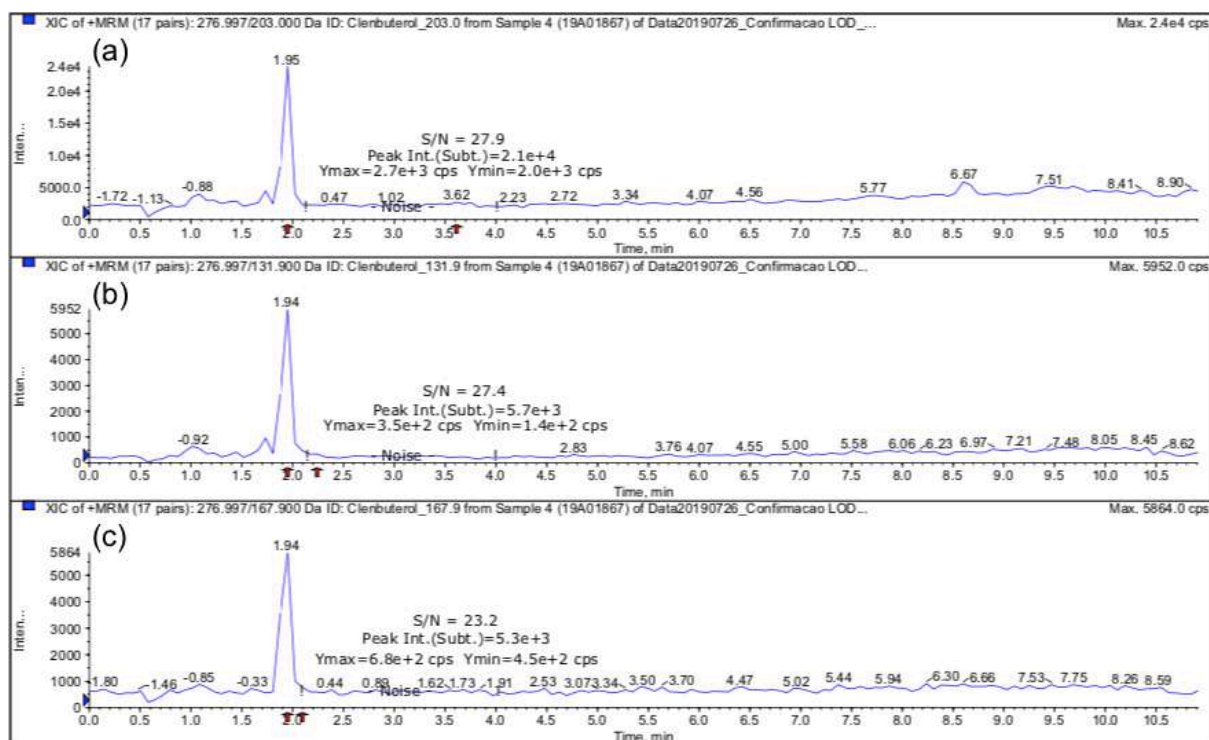
[9] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 09.



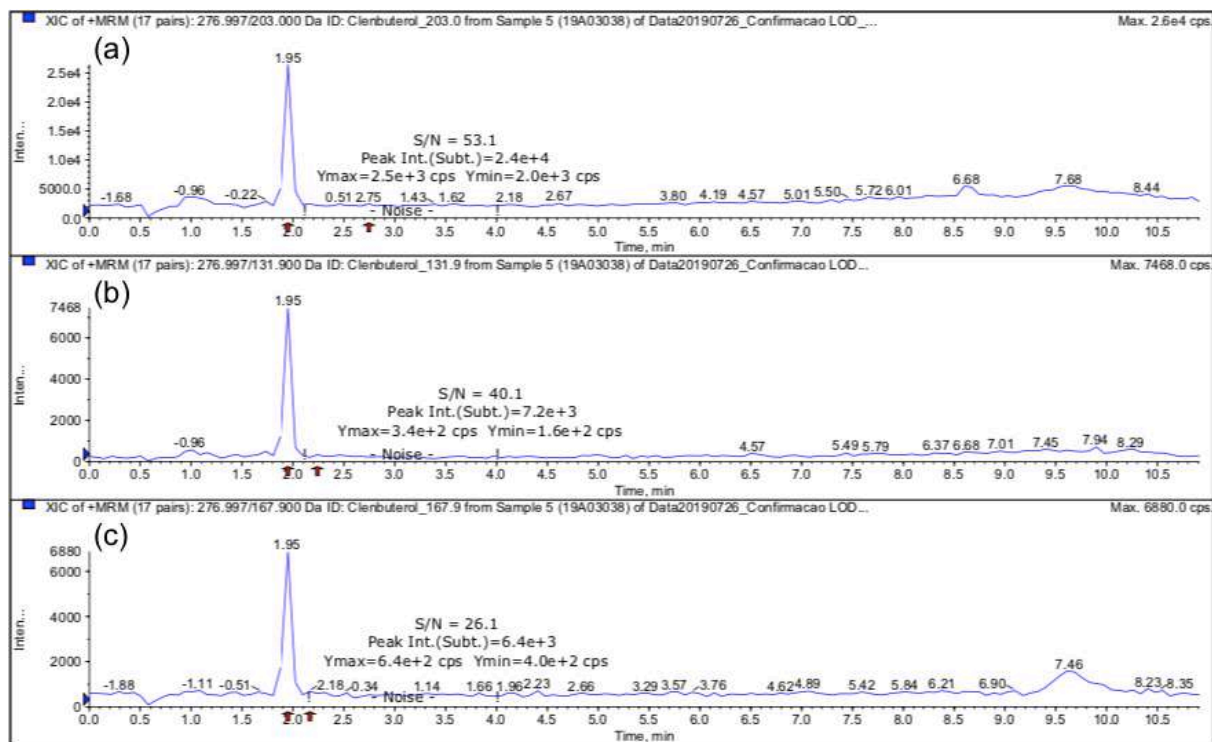
[10] Matriz: Urina (0,20 ng/mL) – Branco 10.



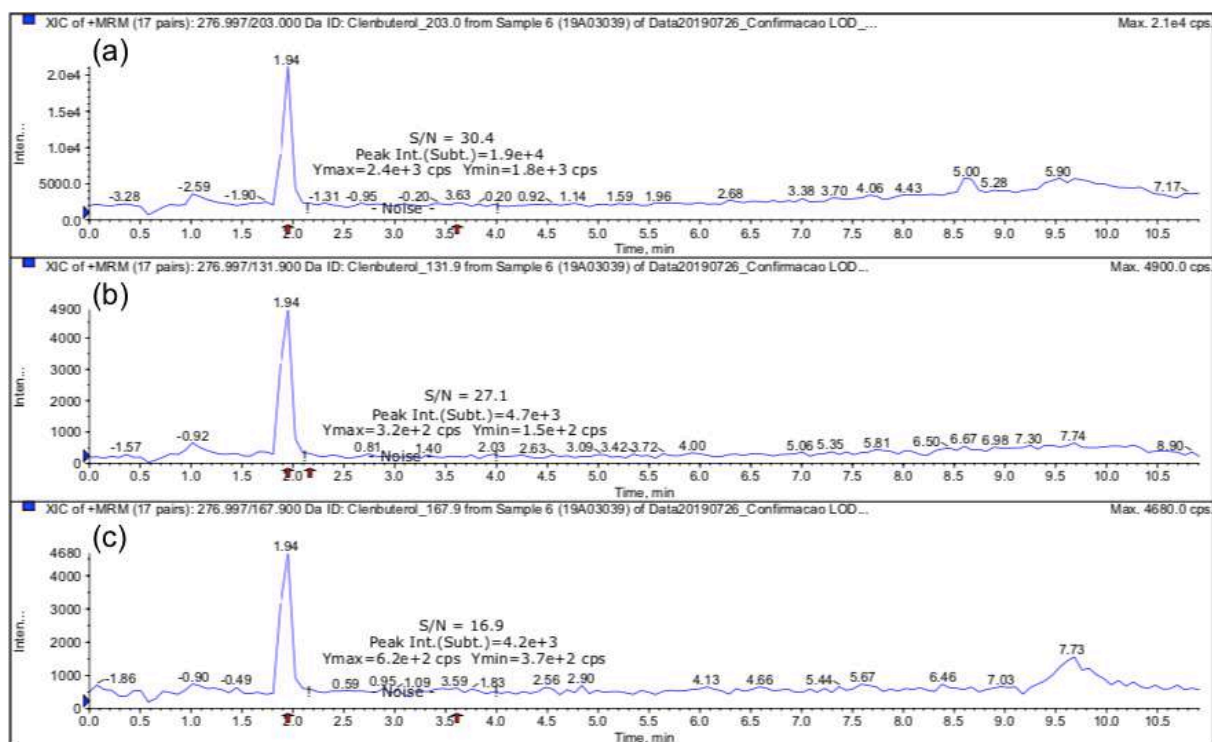
[11] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 01.



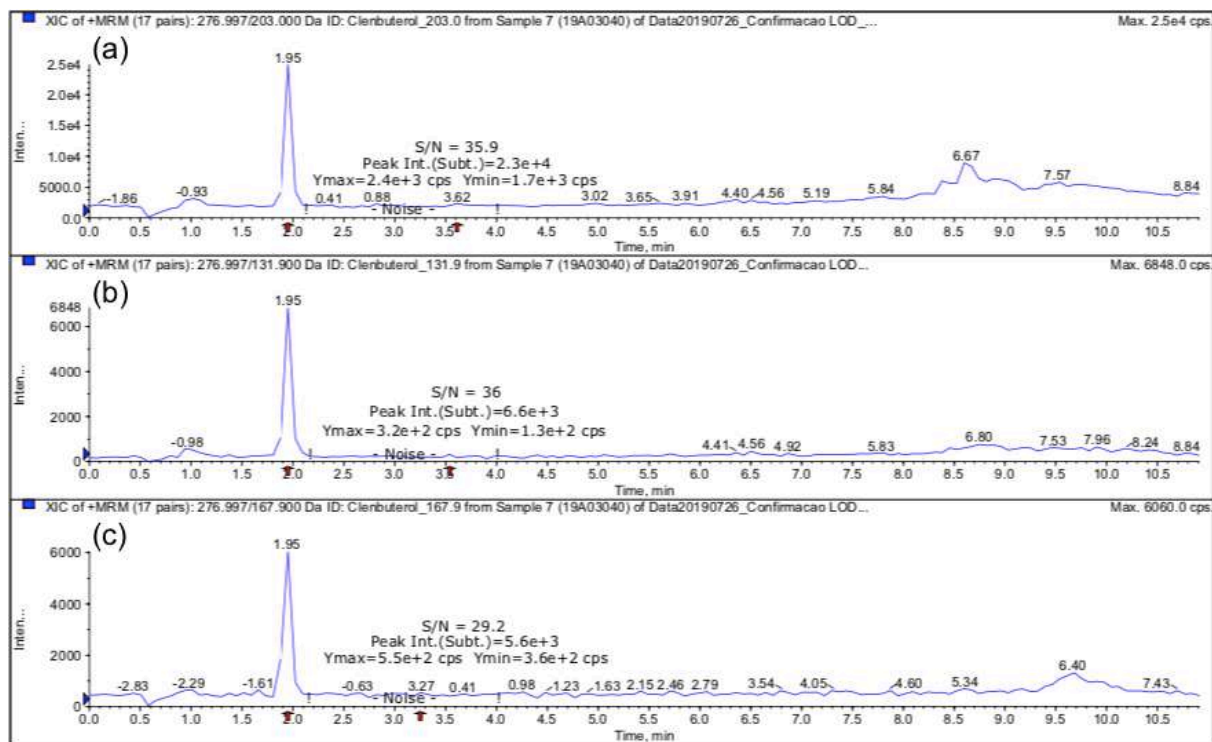
[12] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 02.



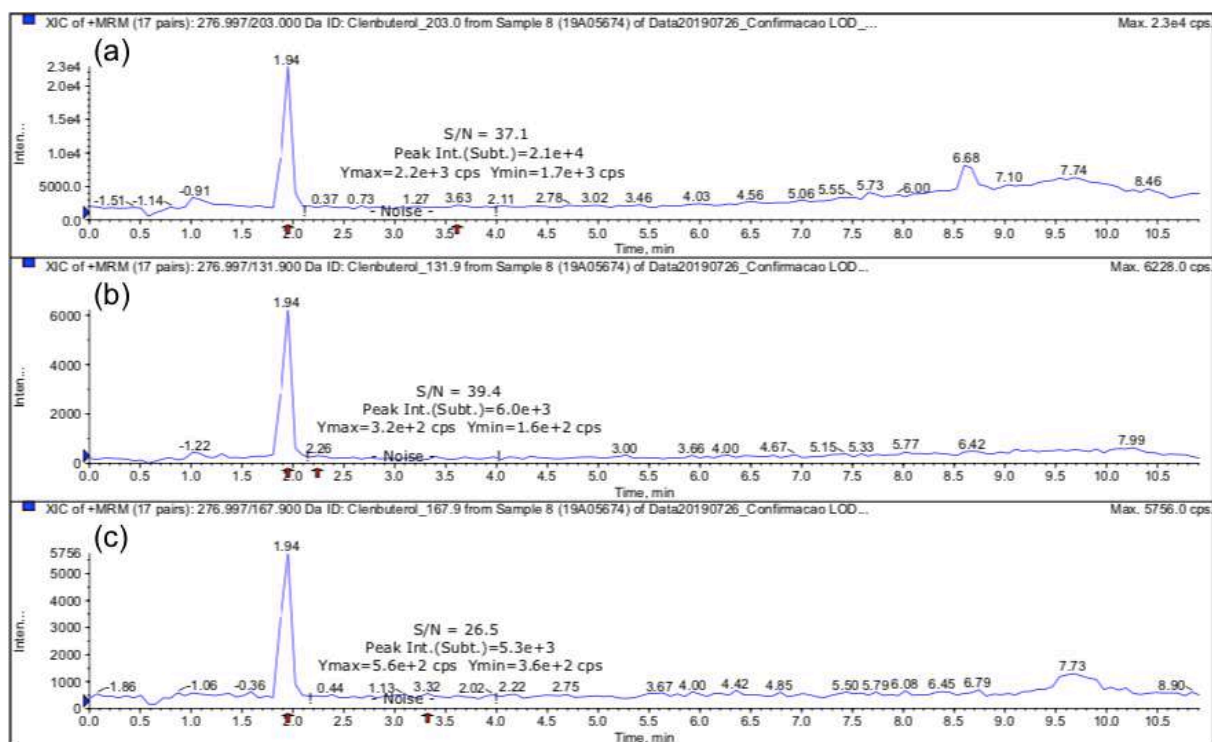
[13] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 03.



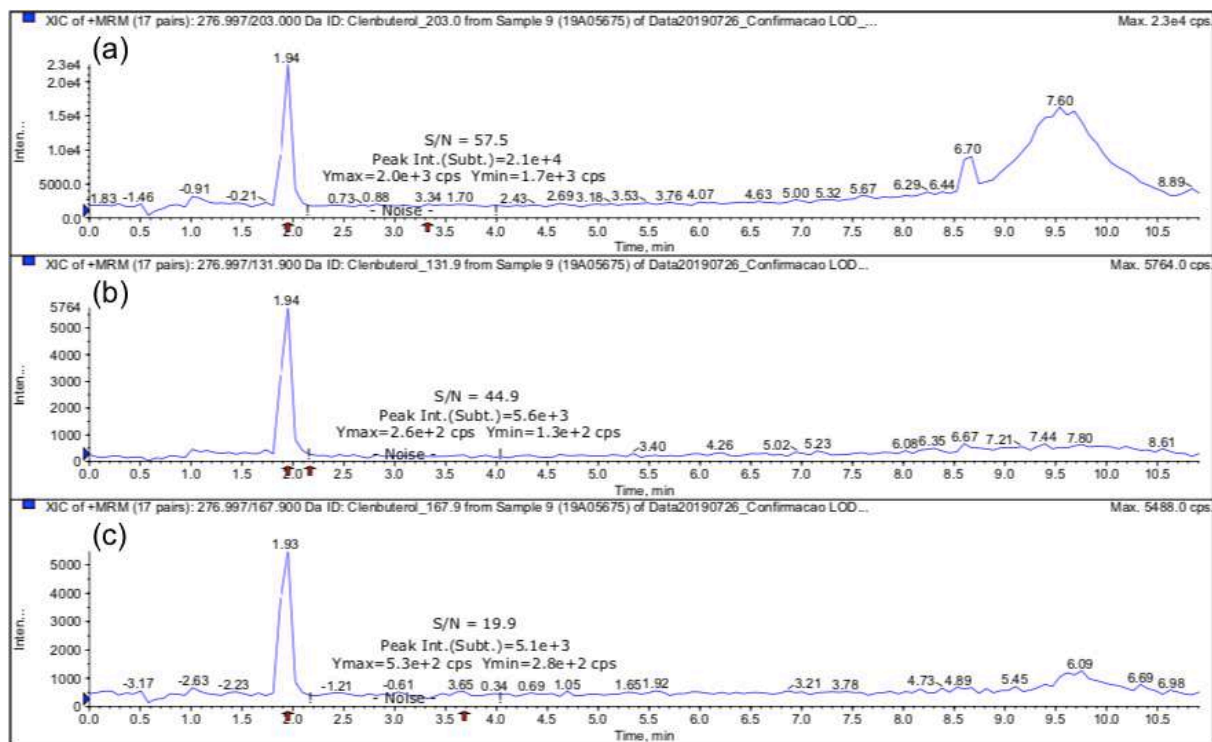
[14] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 04.



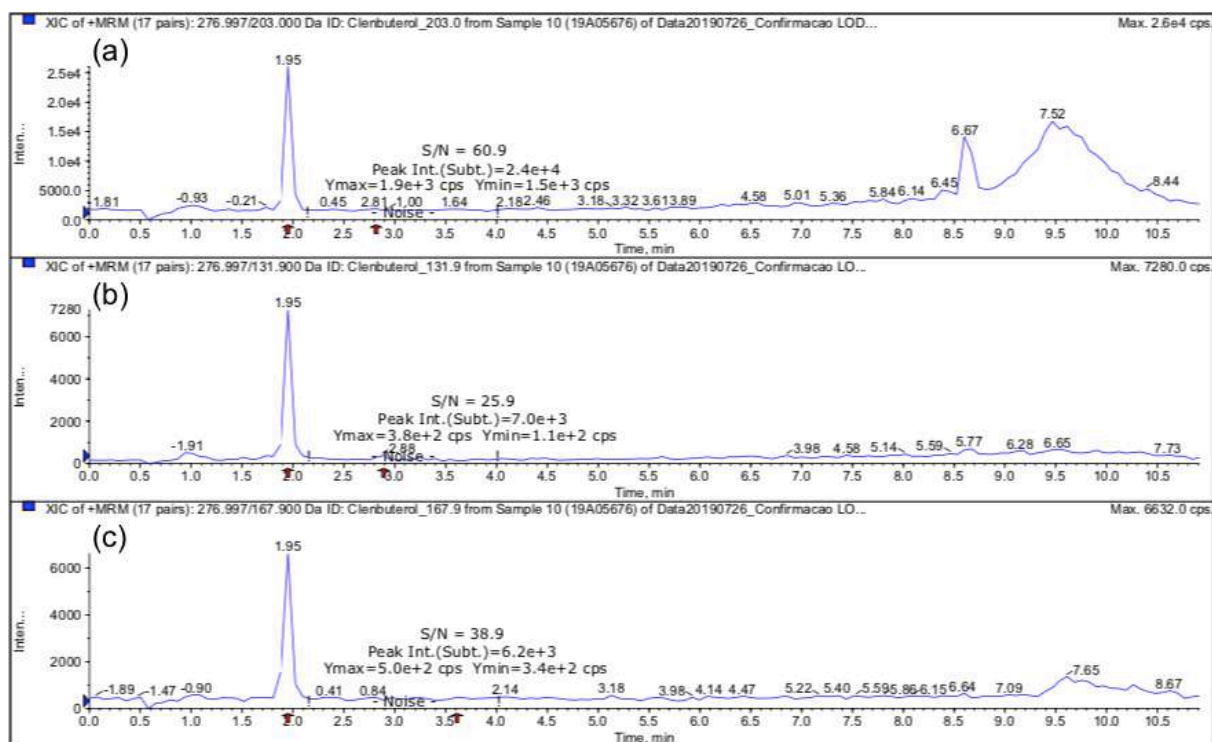
[15] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 05.



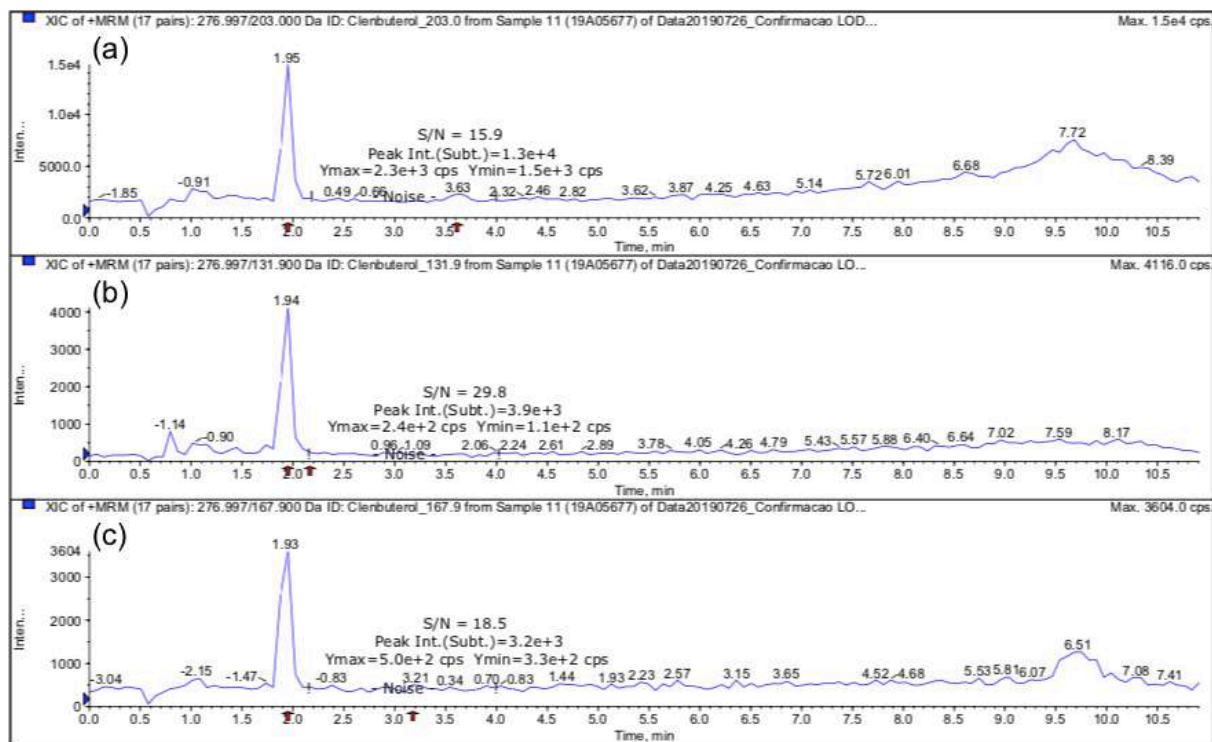
[16] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 06.



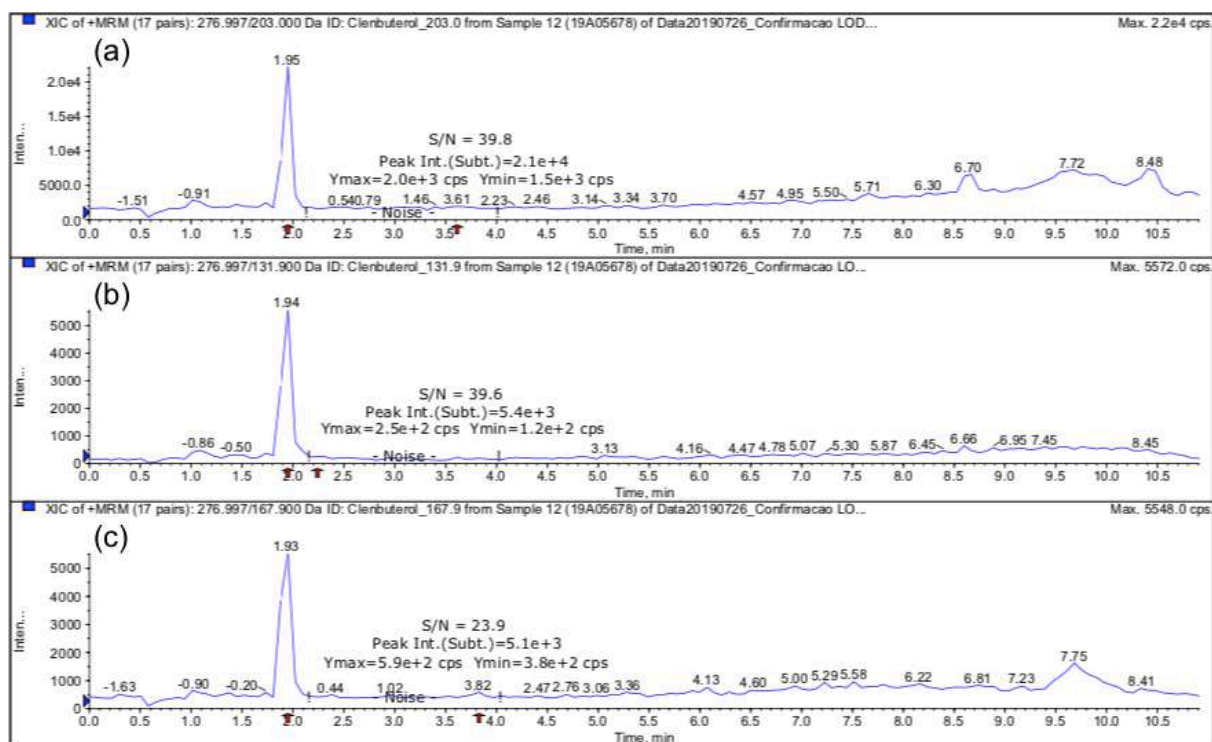
[17] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 07.



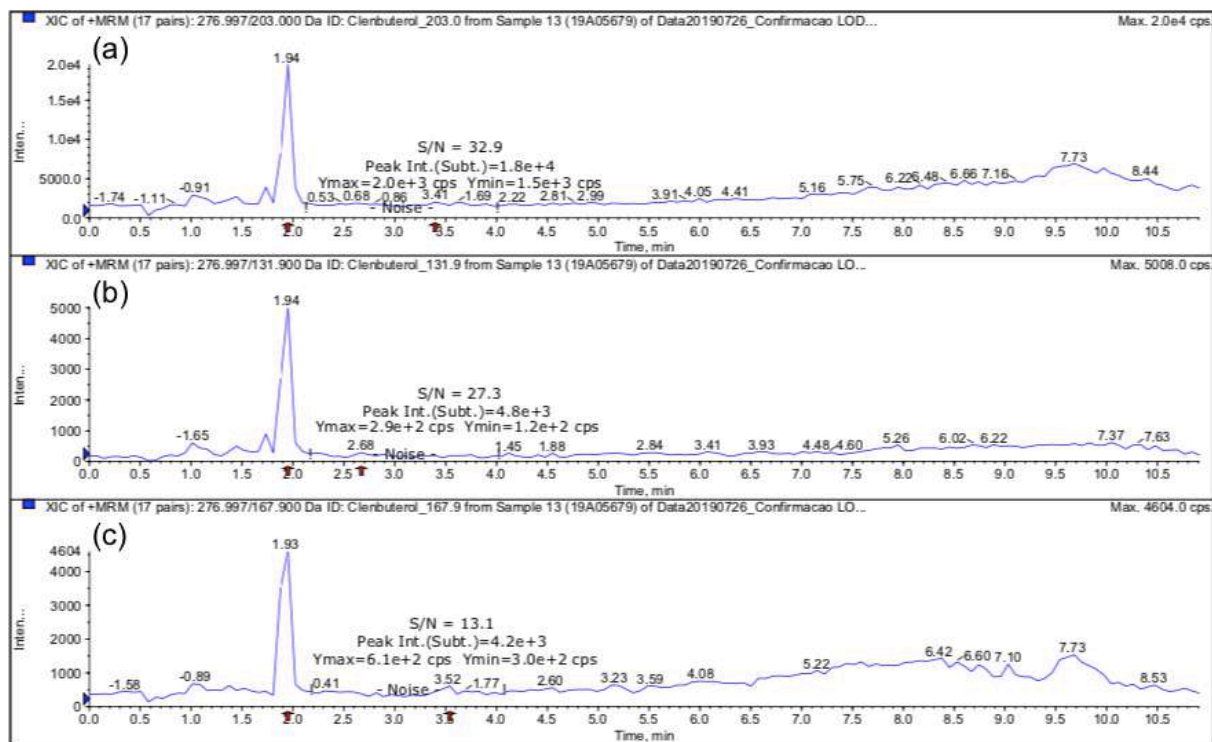
[18] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 08.



[19] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 09.



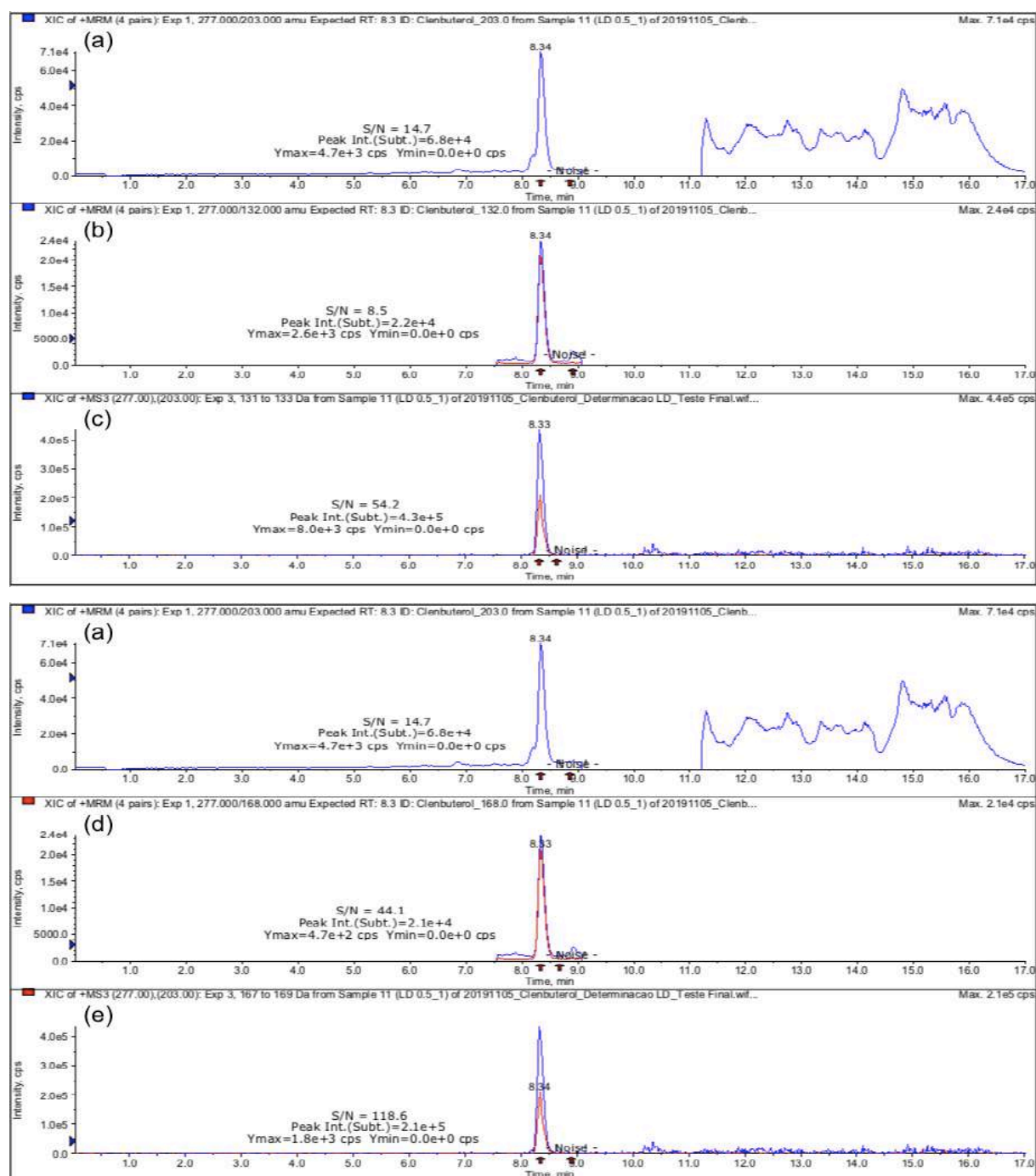
[20] Matriz: Plasma (0,025 ng/mL) – Branco 10.



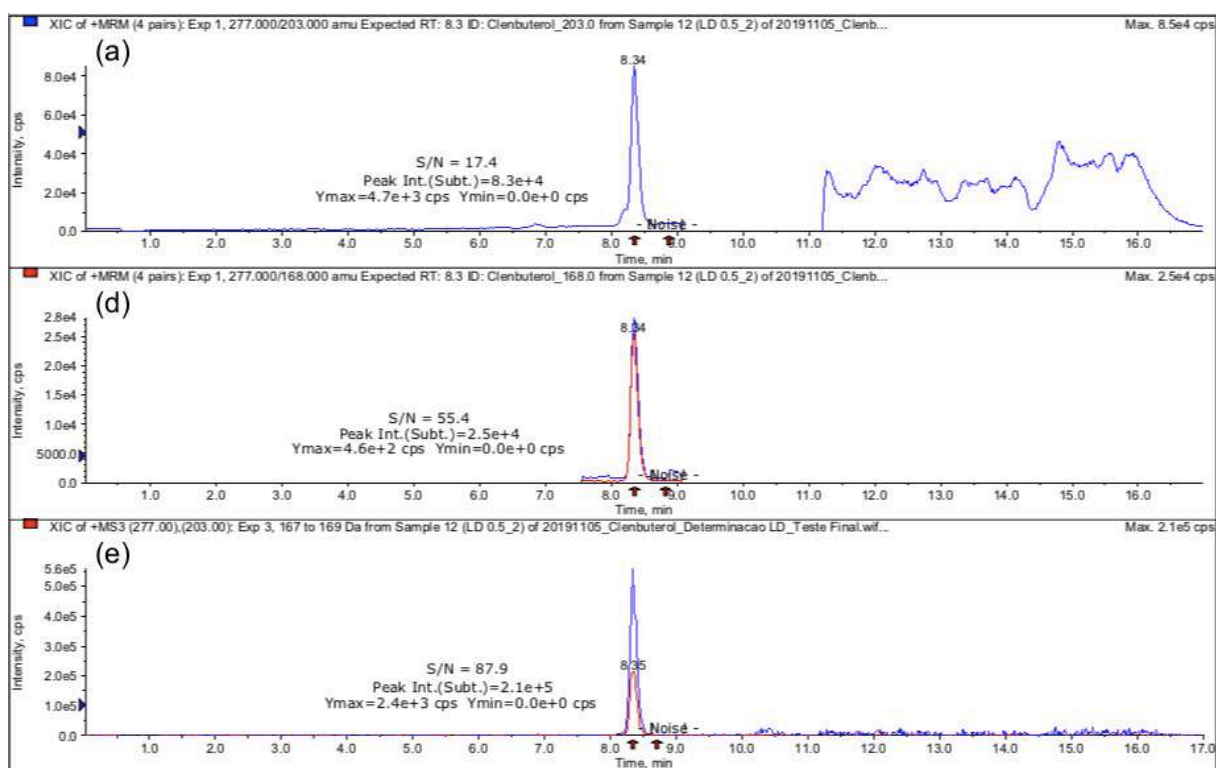
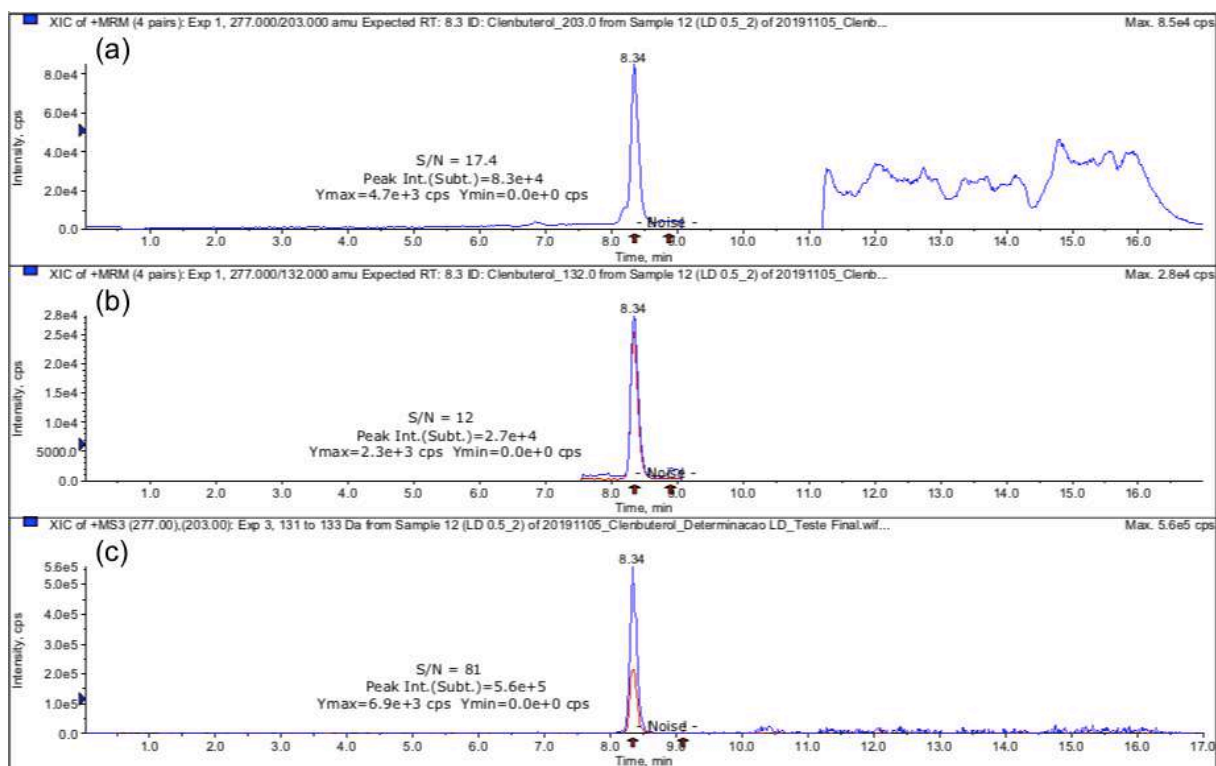
APÊNDICE D – CROMATOGRAMAS PARA O NOVO TESTE DO LIMITE DE DETECÇÃO

(a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (b) / (d) fragmento 132,0 / 168,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (c) / (e) fragmento 132,0 / 168,0 Da do clenbuterol no modo +MS3.

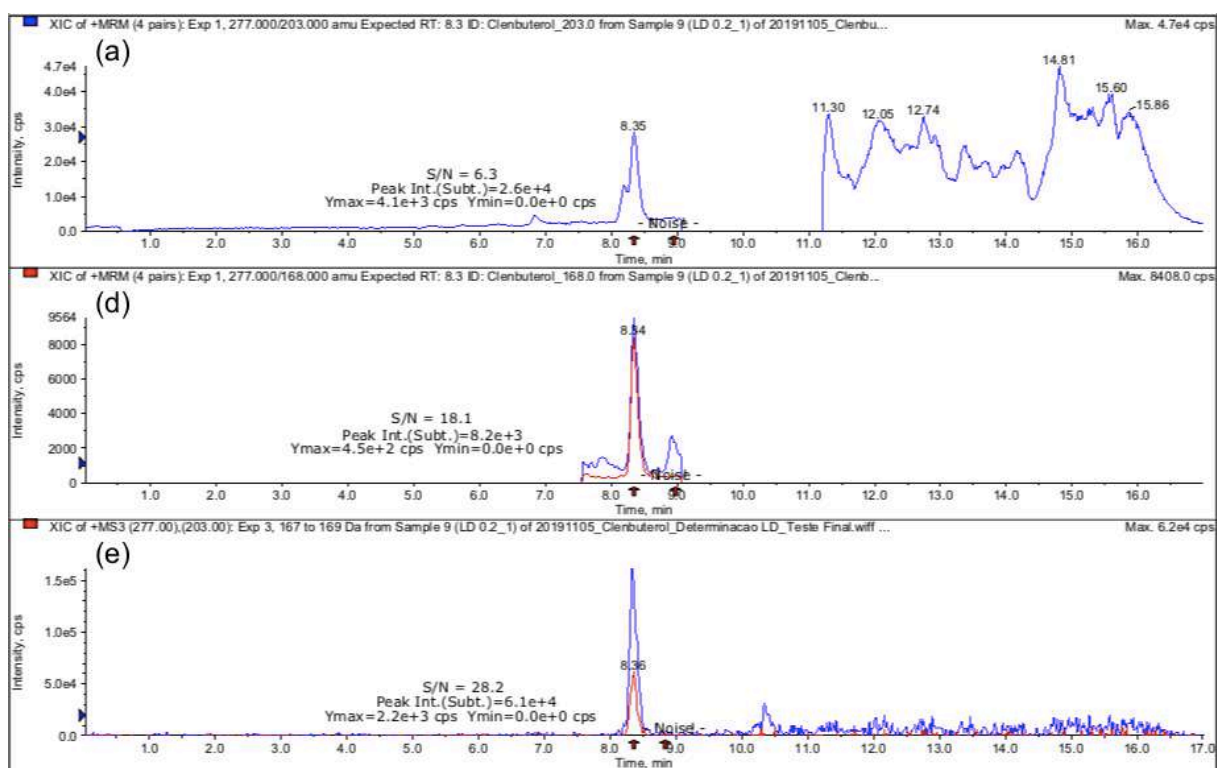
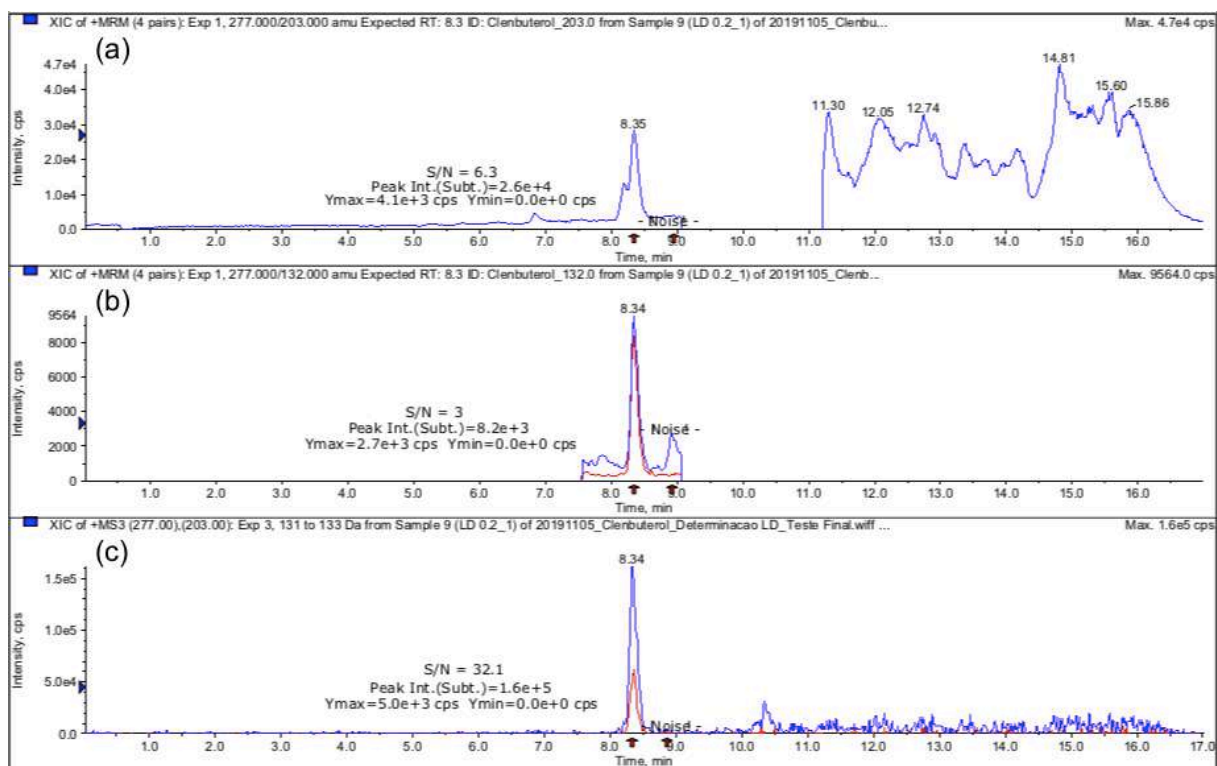
[1] Matriz: Urina – Concentração 0,50 ng/mL – Primeira amostra.



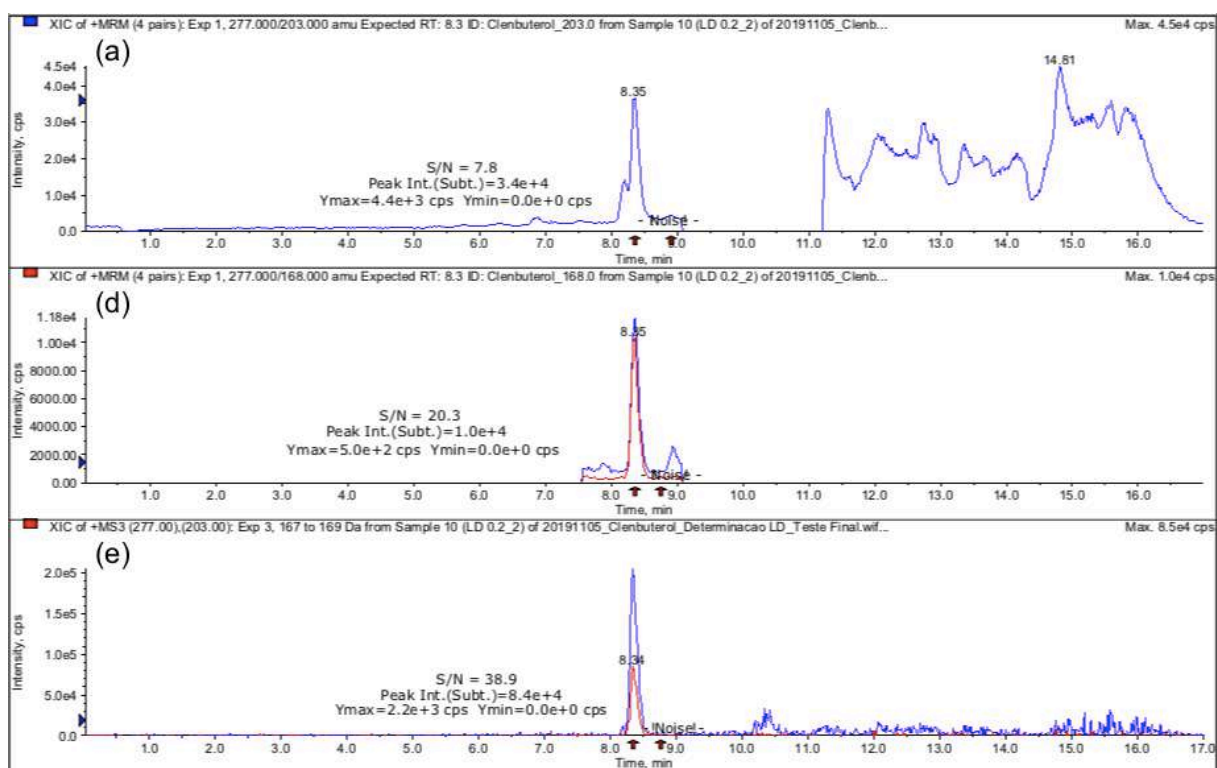
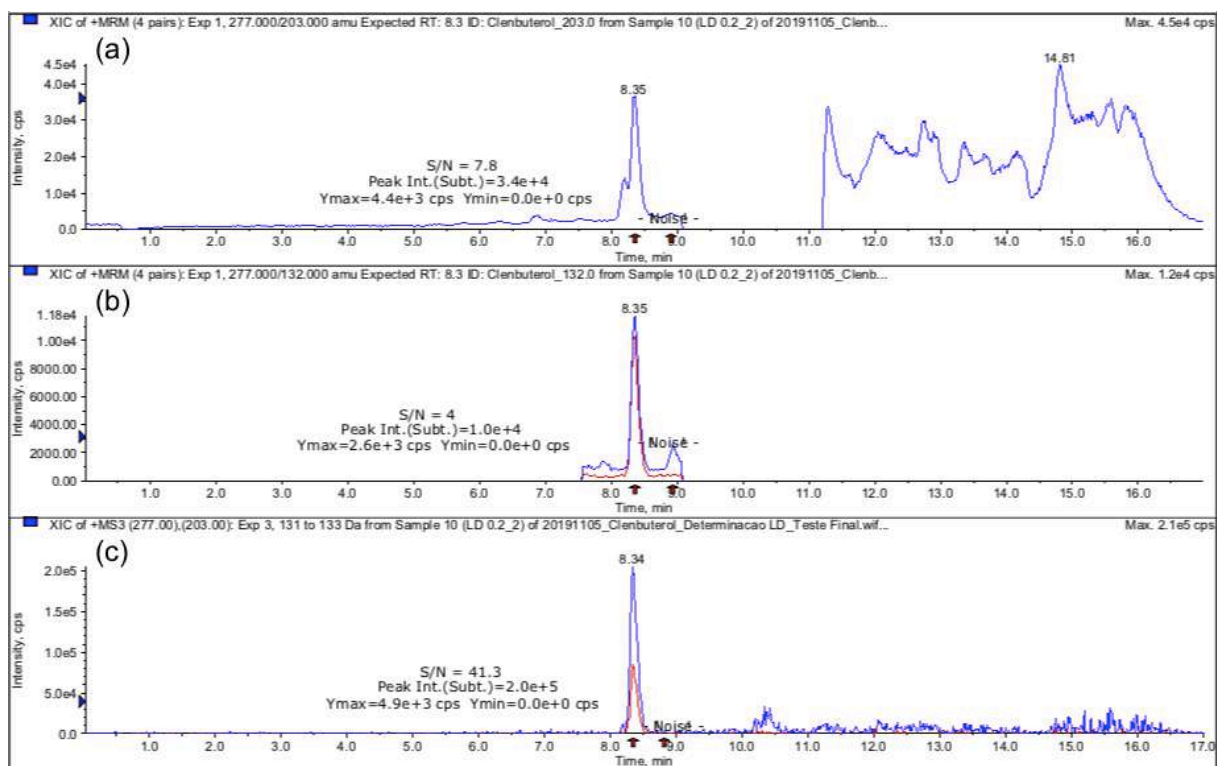
[2] Matriz: Urina – Concentração 0,50 ng/mL – Segunda amostra.



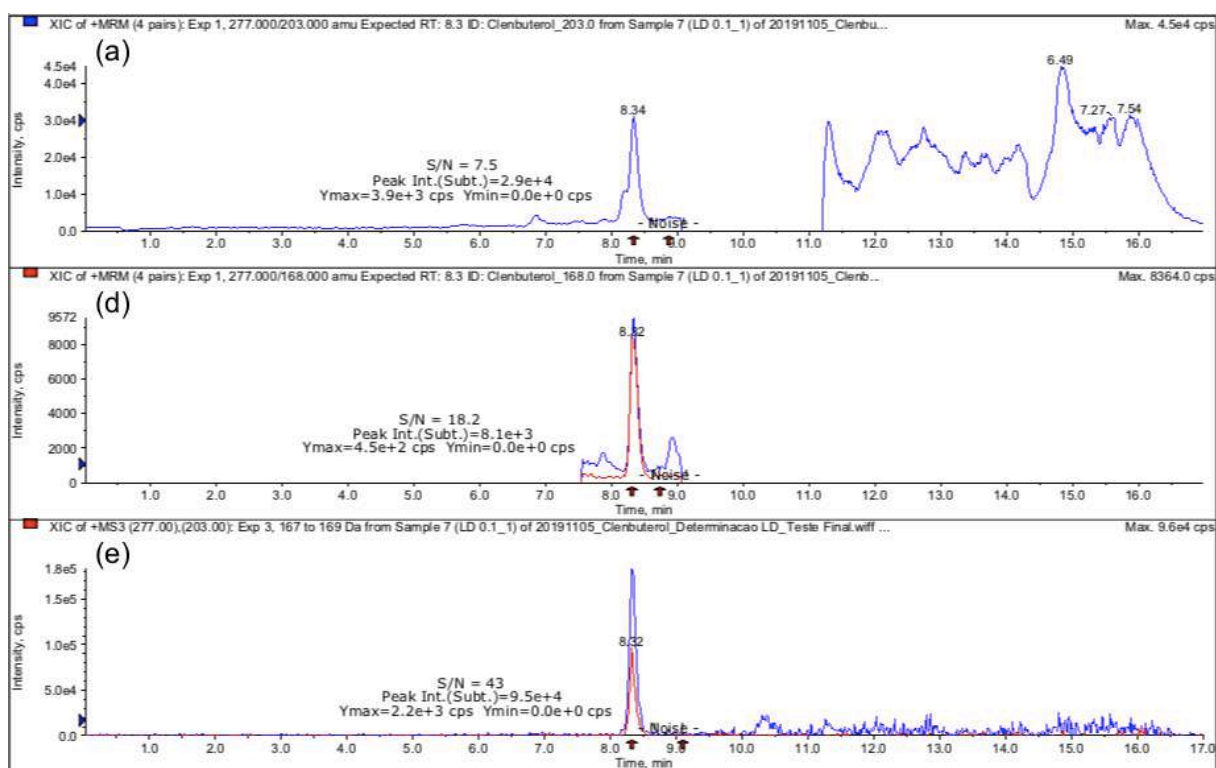
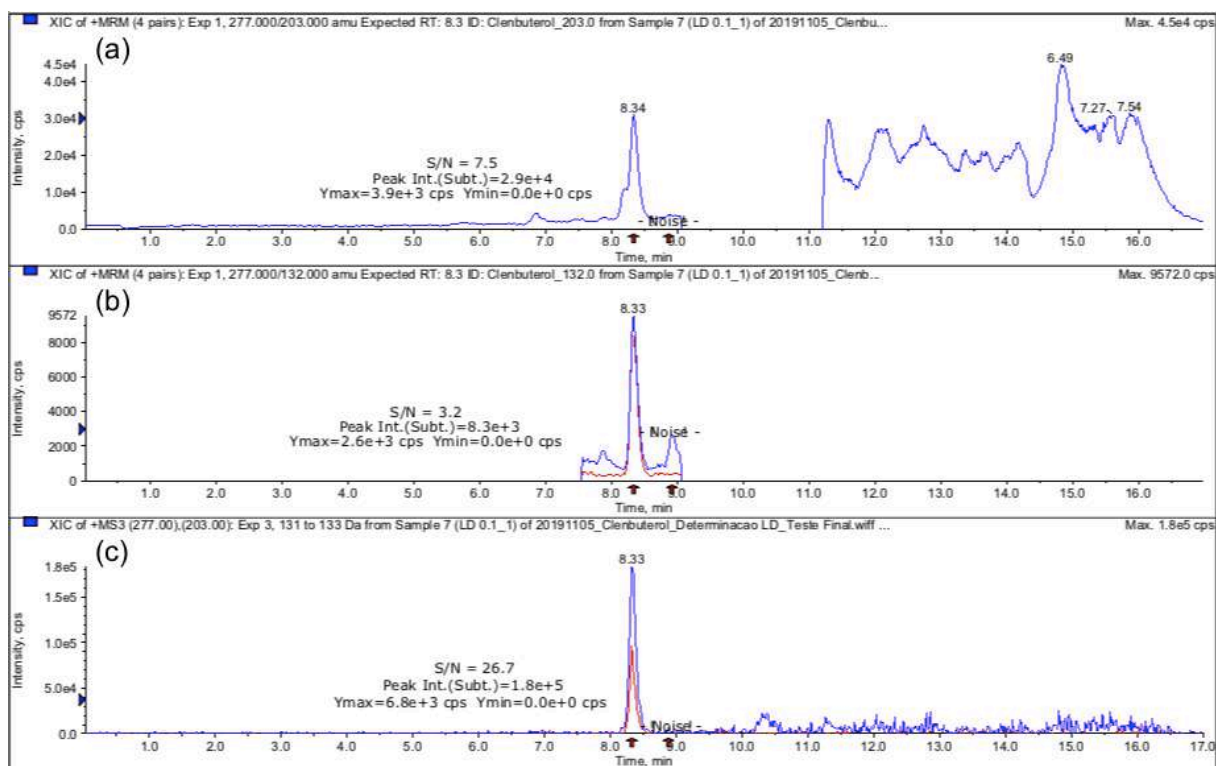
[3] Matriz: Urina – Concentração 0,20 ng/mL – Primeira amostra.



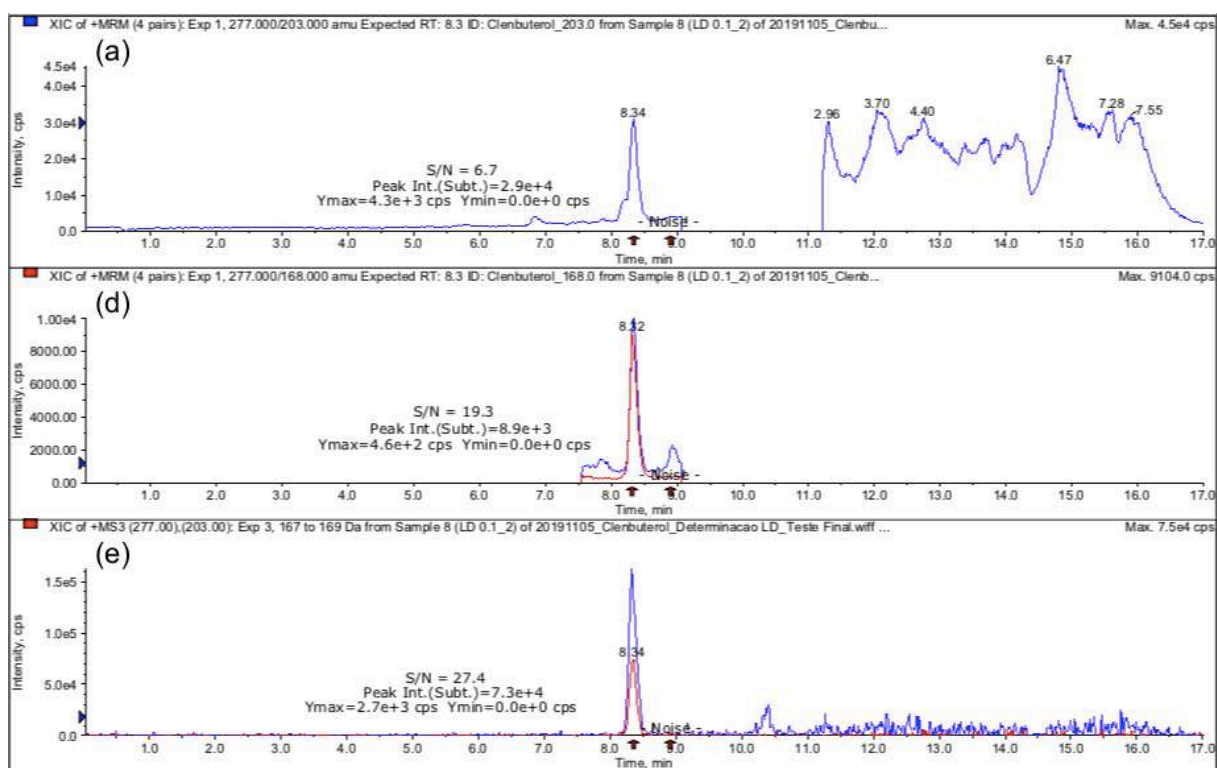
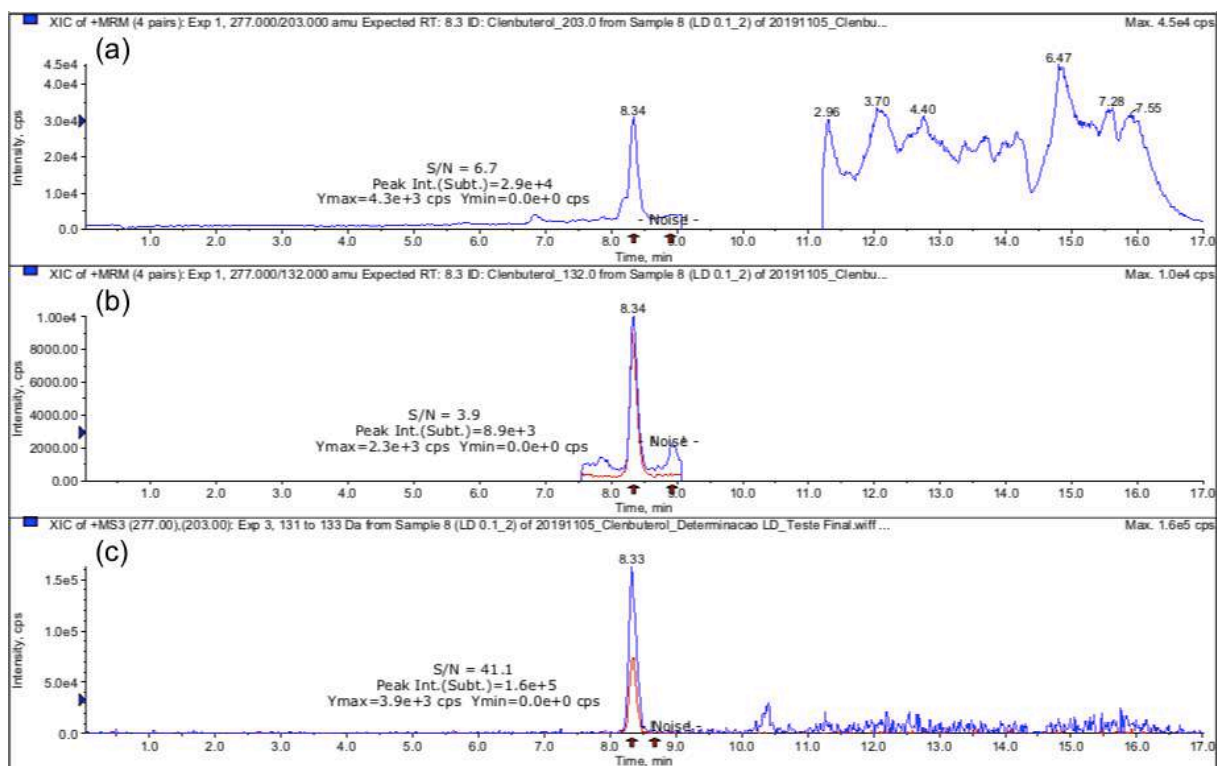
[4] Matriz: Urina – Concentração 0,20 ng/mL – Segunda amostra.



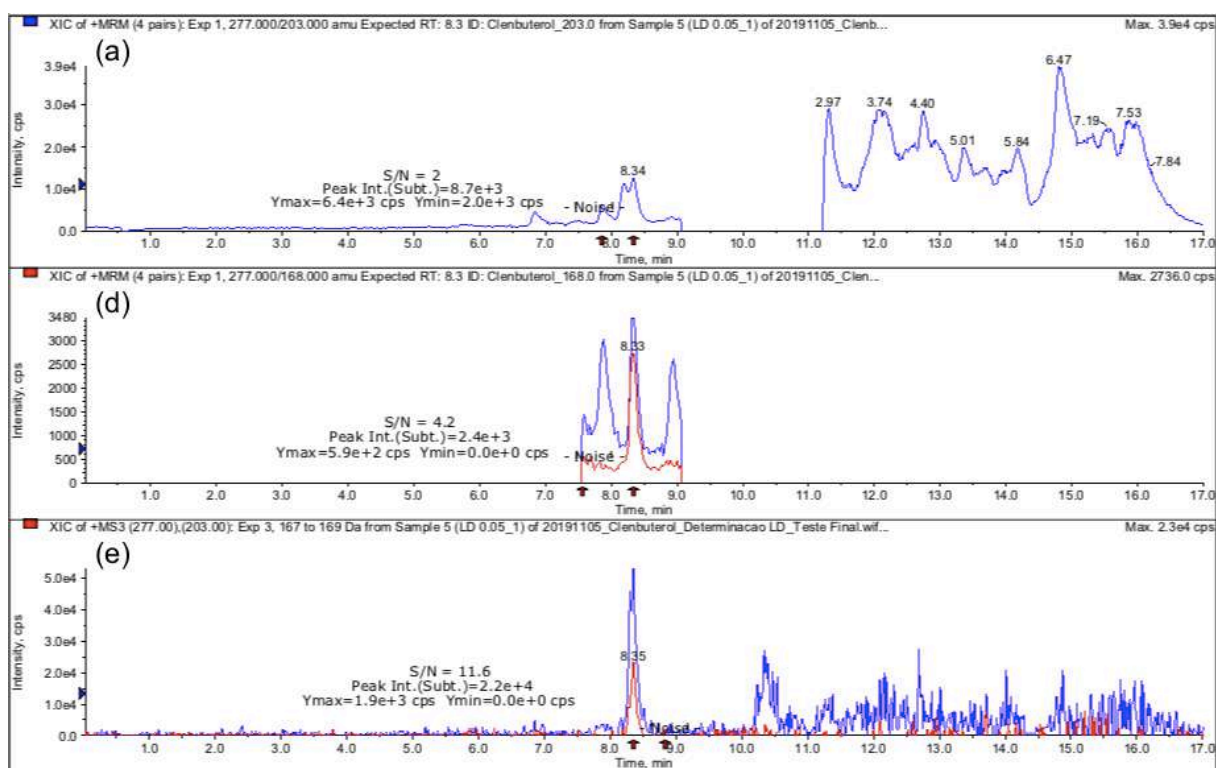
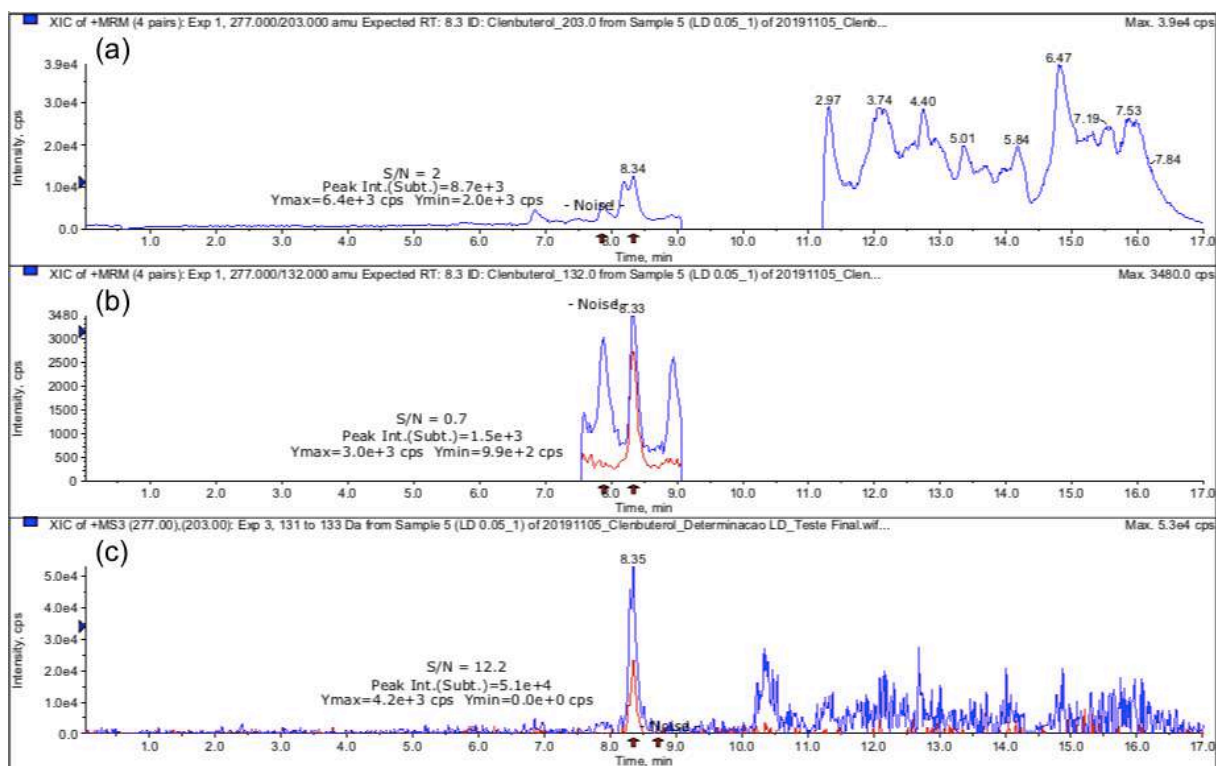
[5] Matriz: Urina – Concentração 0,10 ng/mL – Primeira amostra.



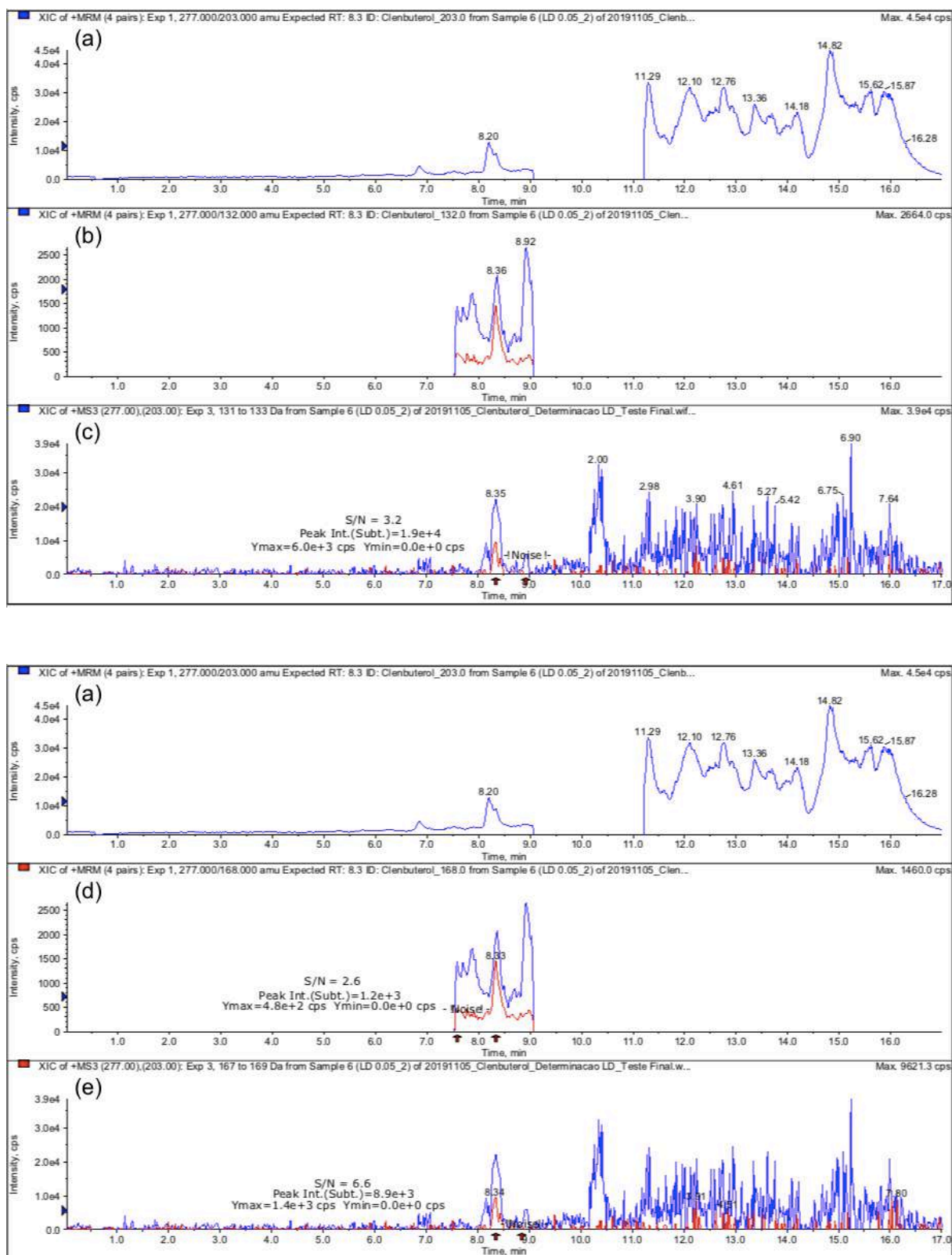
[6] Matriz: Urina – Concentração 0,10 ng/mL – Segunda amostra.



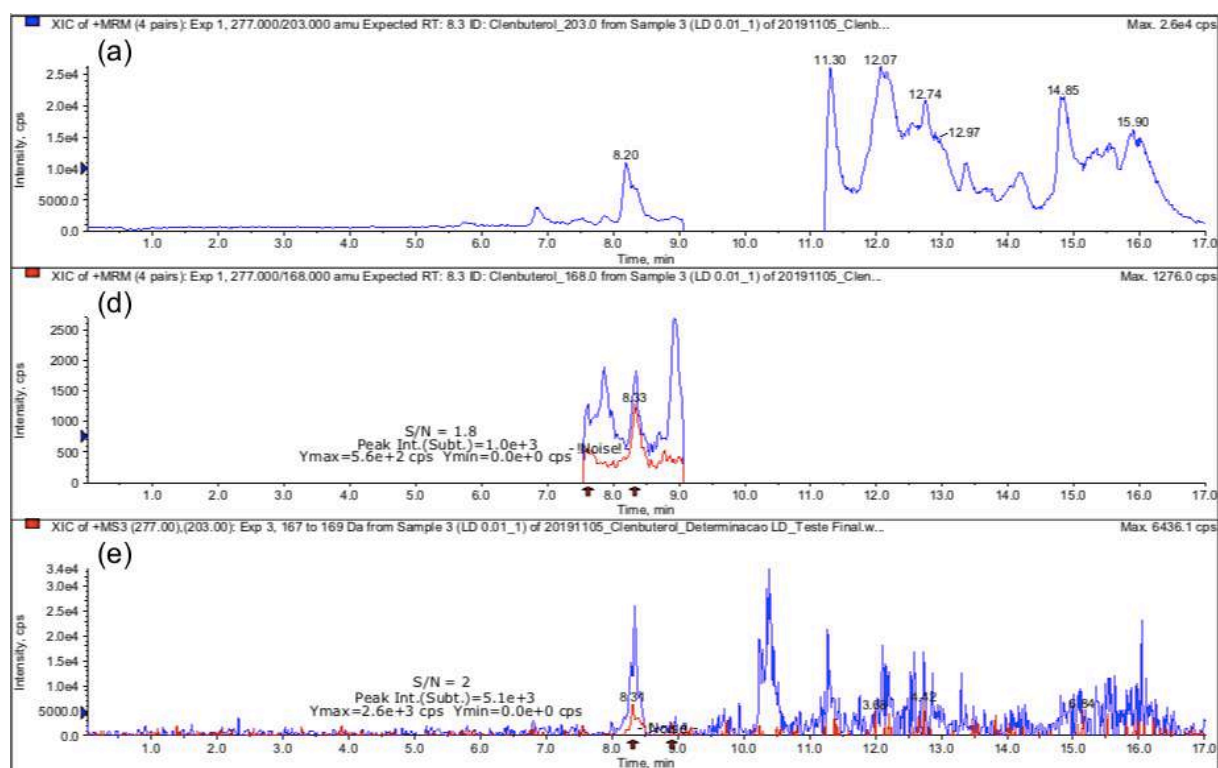
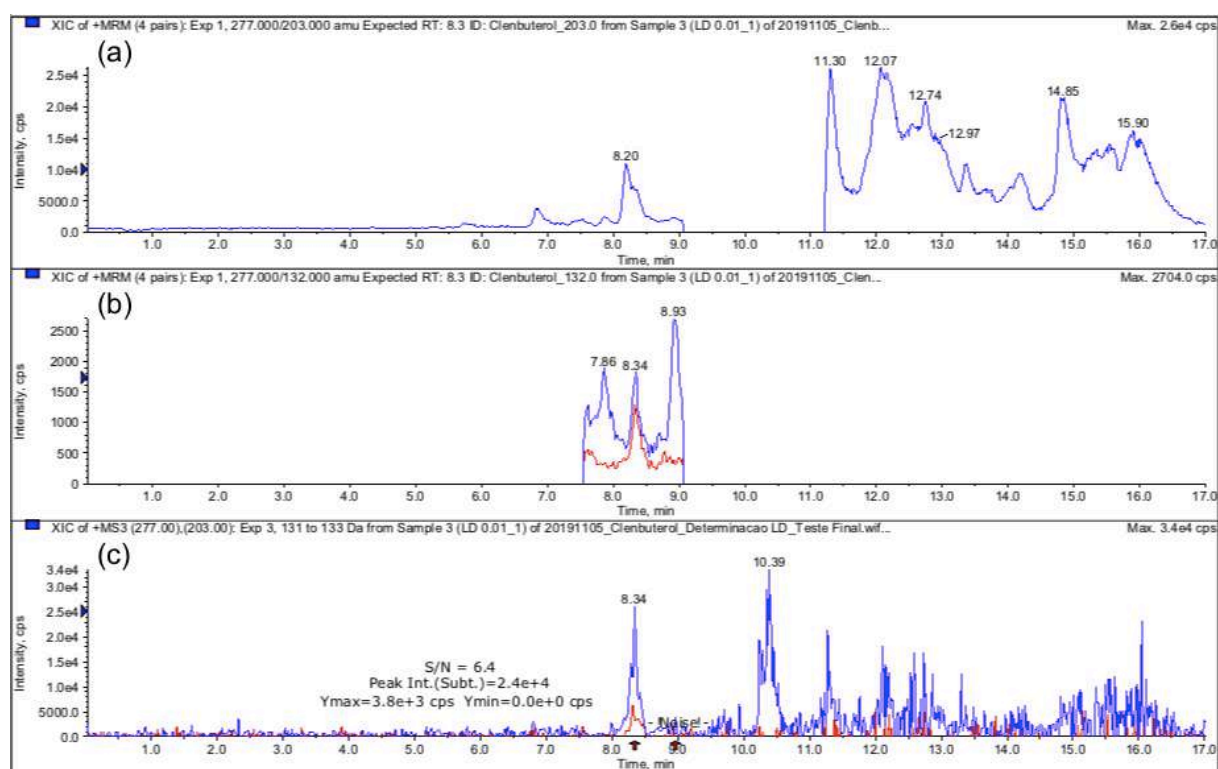
[7] Matriz: Urina – Concentração 0,05 ng/mL – Primeira amostra.



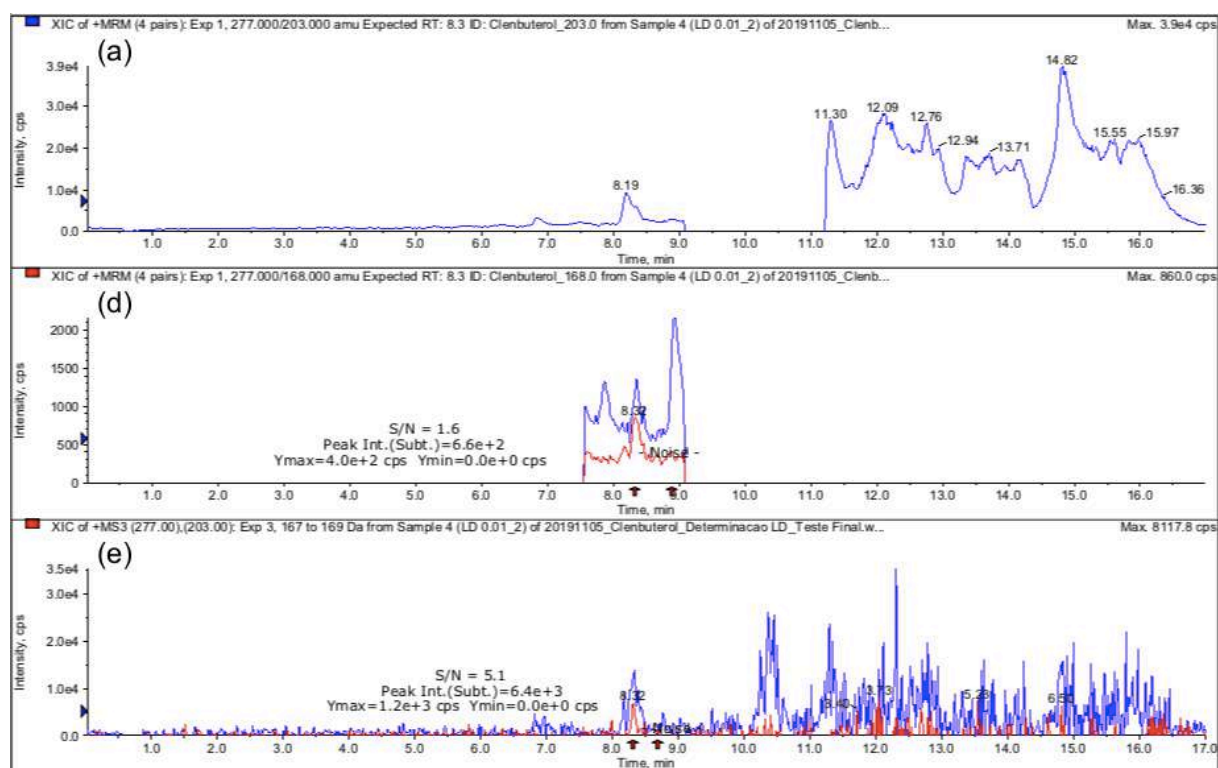
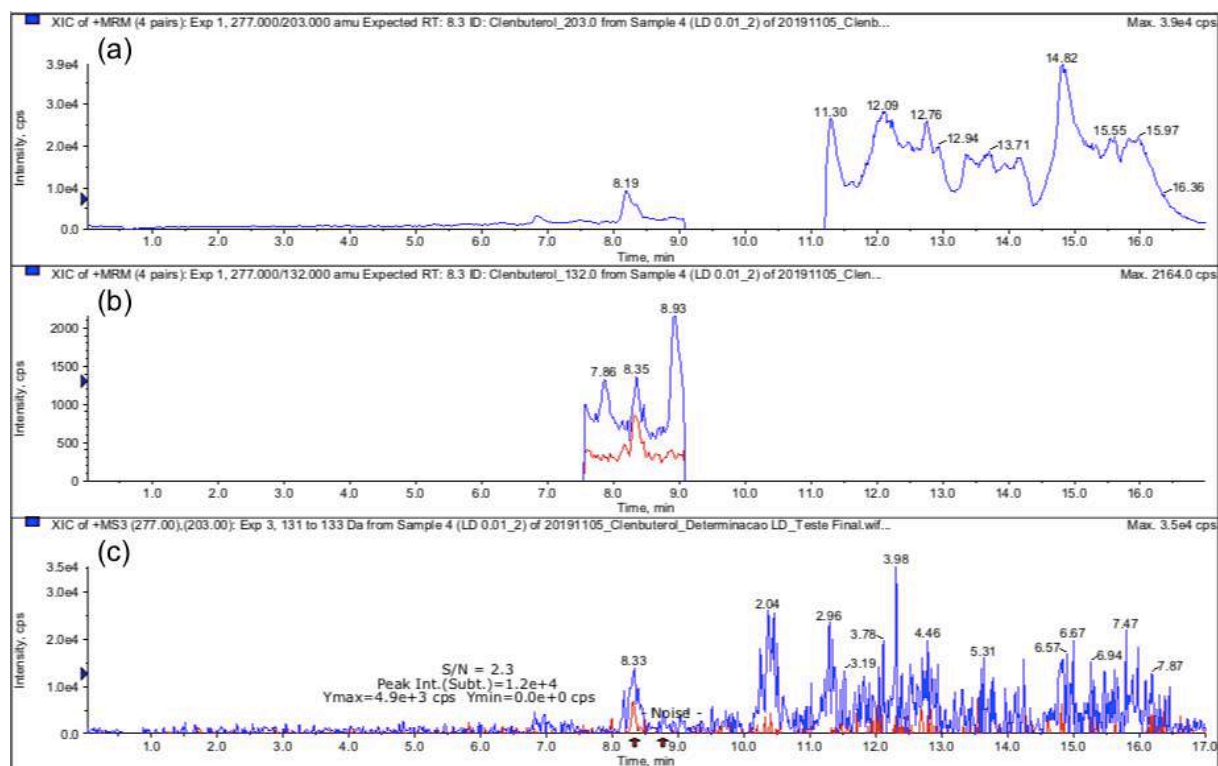
[8] Matriz: Urina – Concentração 0,05 ng/mL – Segunda amostra.



[9] Matriz: Urina – Concentração 0,01 ng/mL – Primeira amostra.



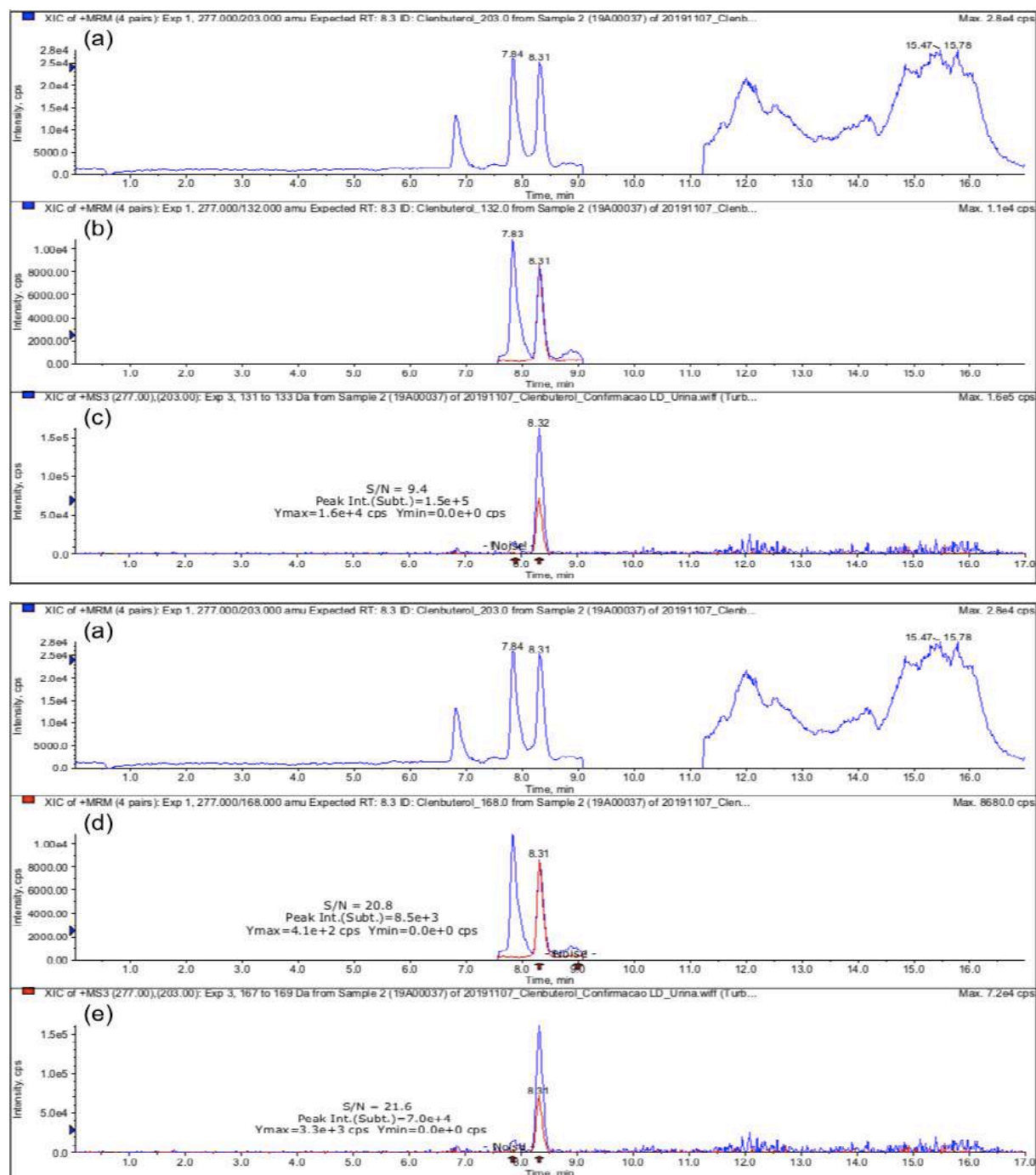
[10] Matriz: Urina – Concentração 0,01 ng/mL – Segunda amostra.



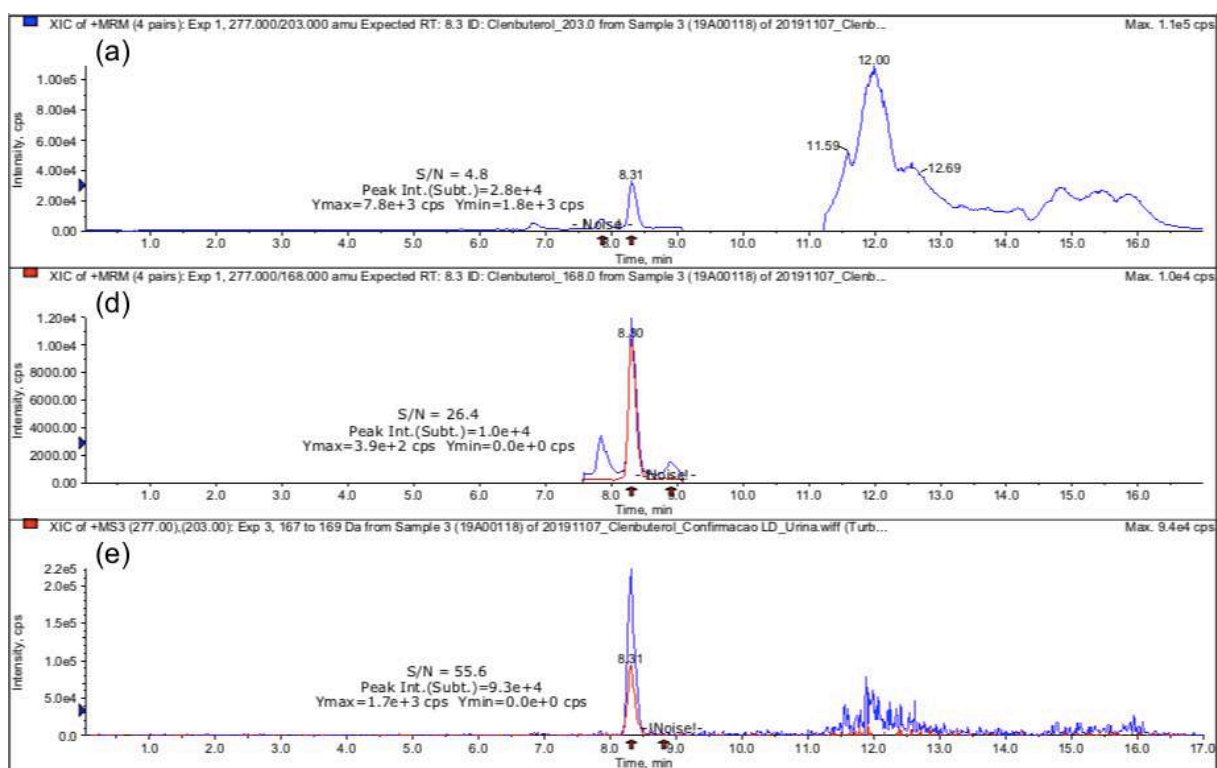
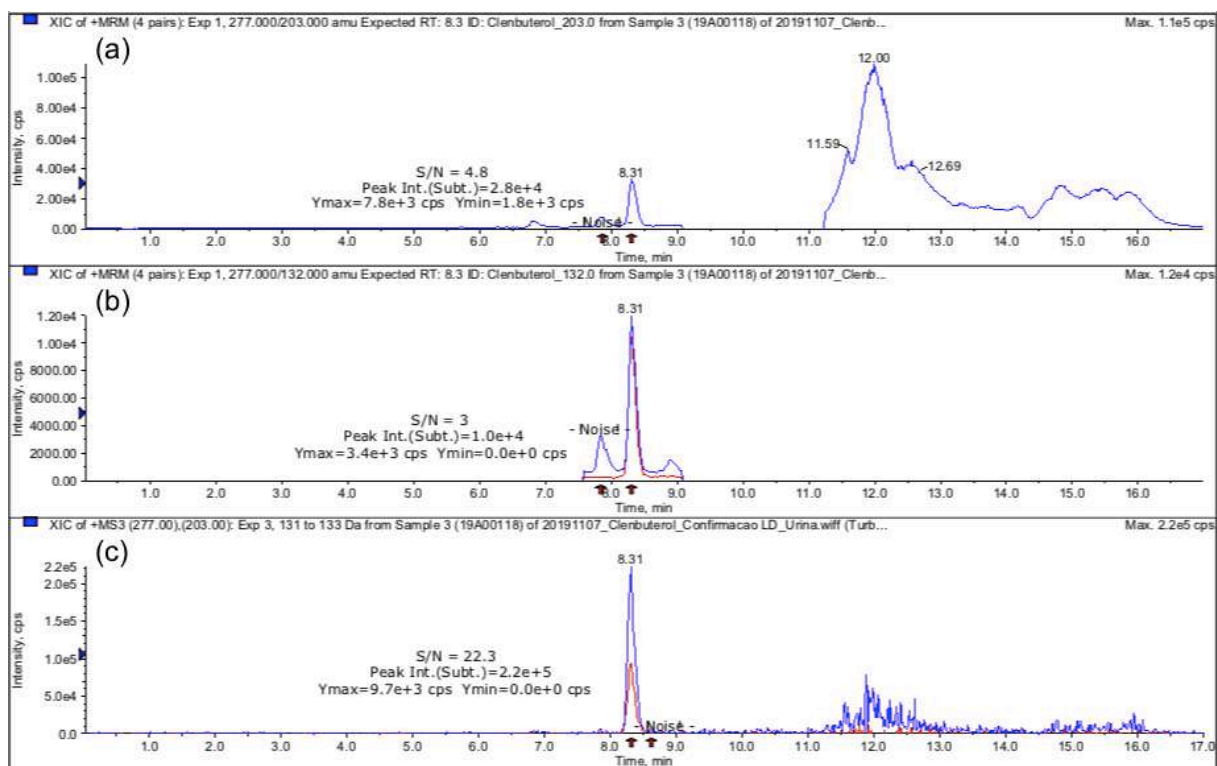
APÊNDICE E – CROMATOGRAMAS PARA A CONFIRMAÇÃO DO LD DO NOVO TESTE

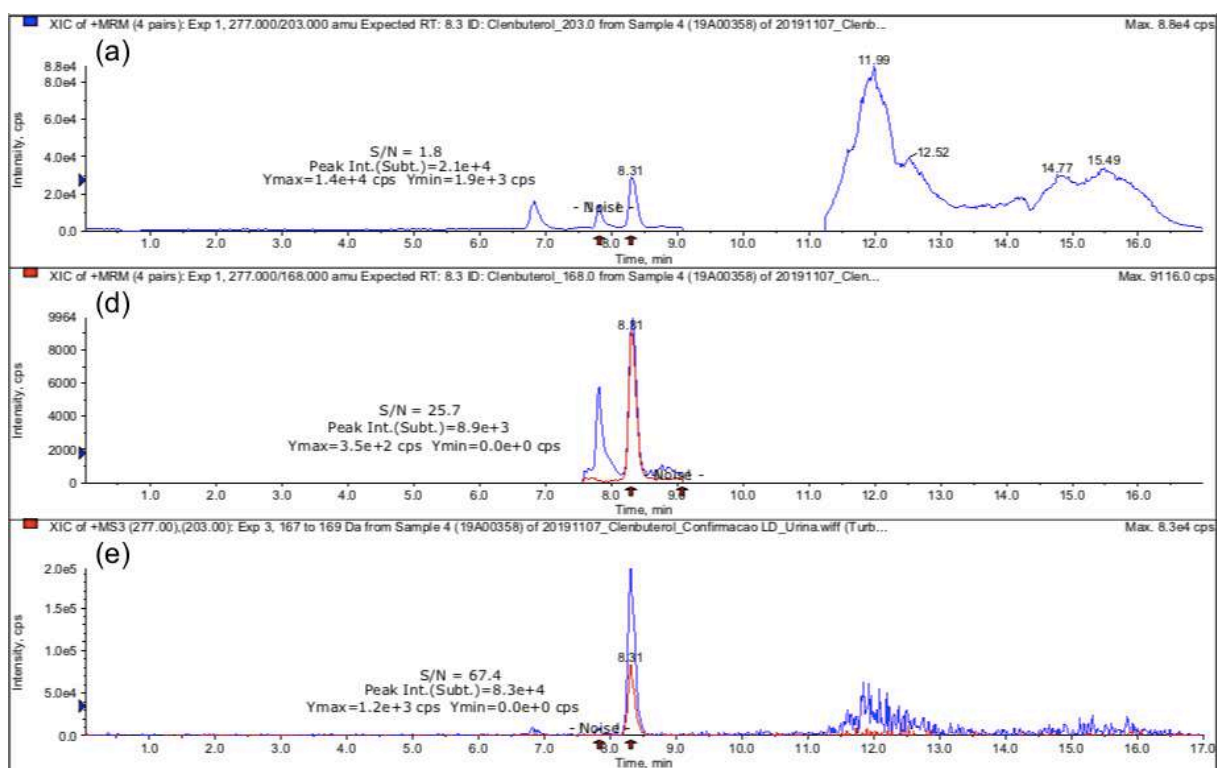
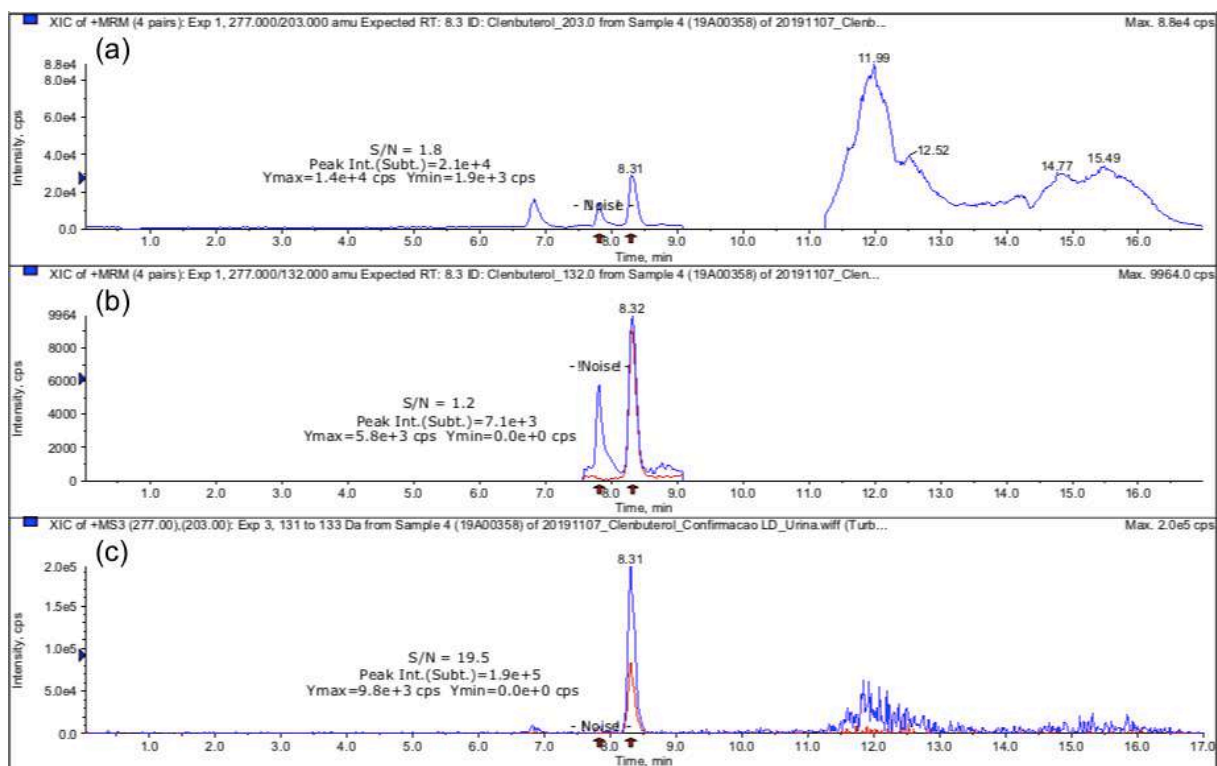
(a) fragmento 203,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (b) / (d) fragmento 132,0 / 168,0 Da do clenbuterol no modo +MRM; (c) / (e) fragmento 132,0 / 168,0 Da do clenbuterol no modo +MS3.

[1] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 01.

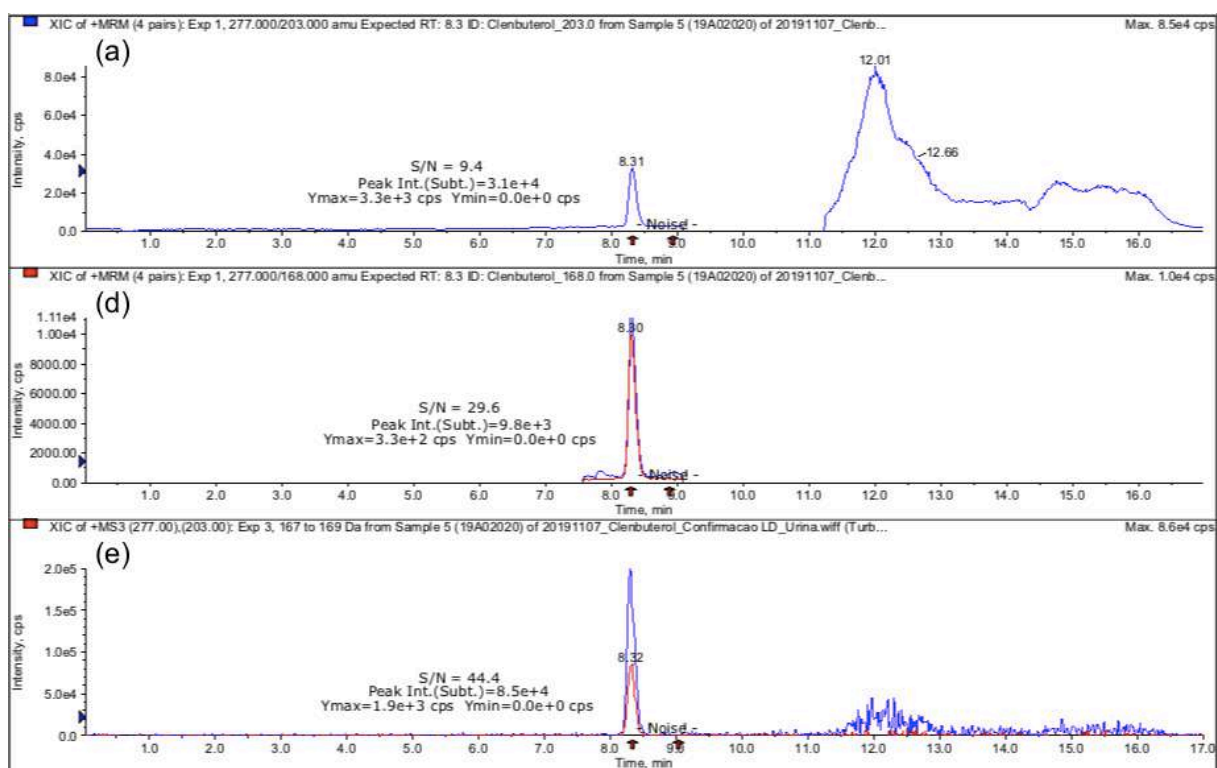
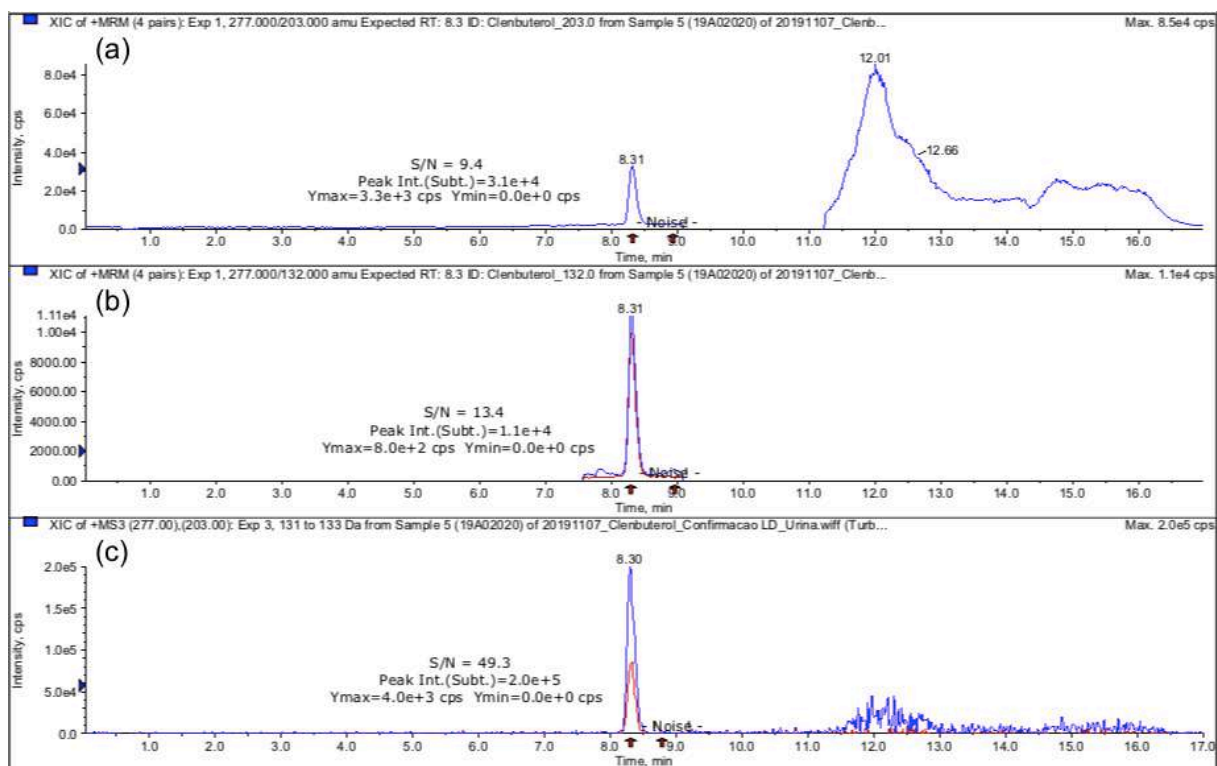


[2] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 02.

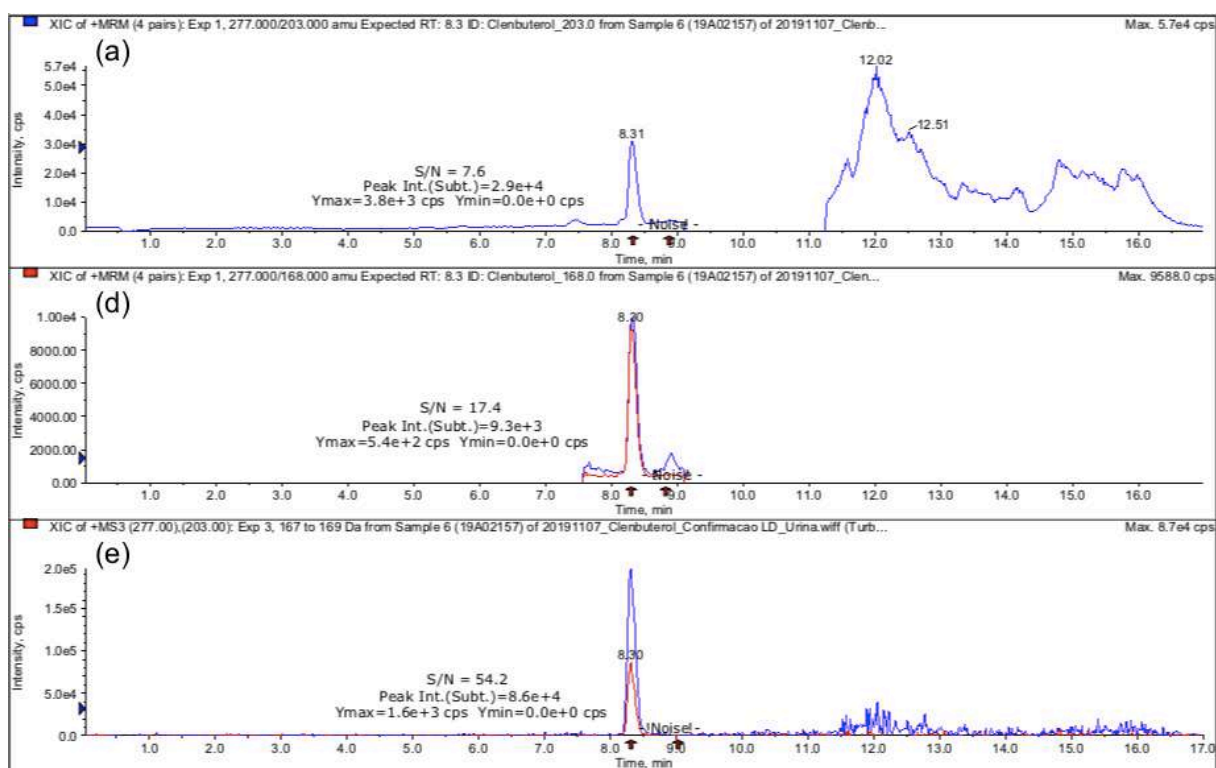
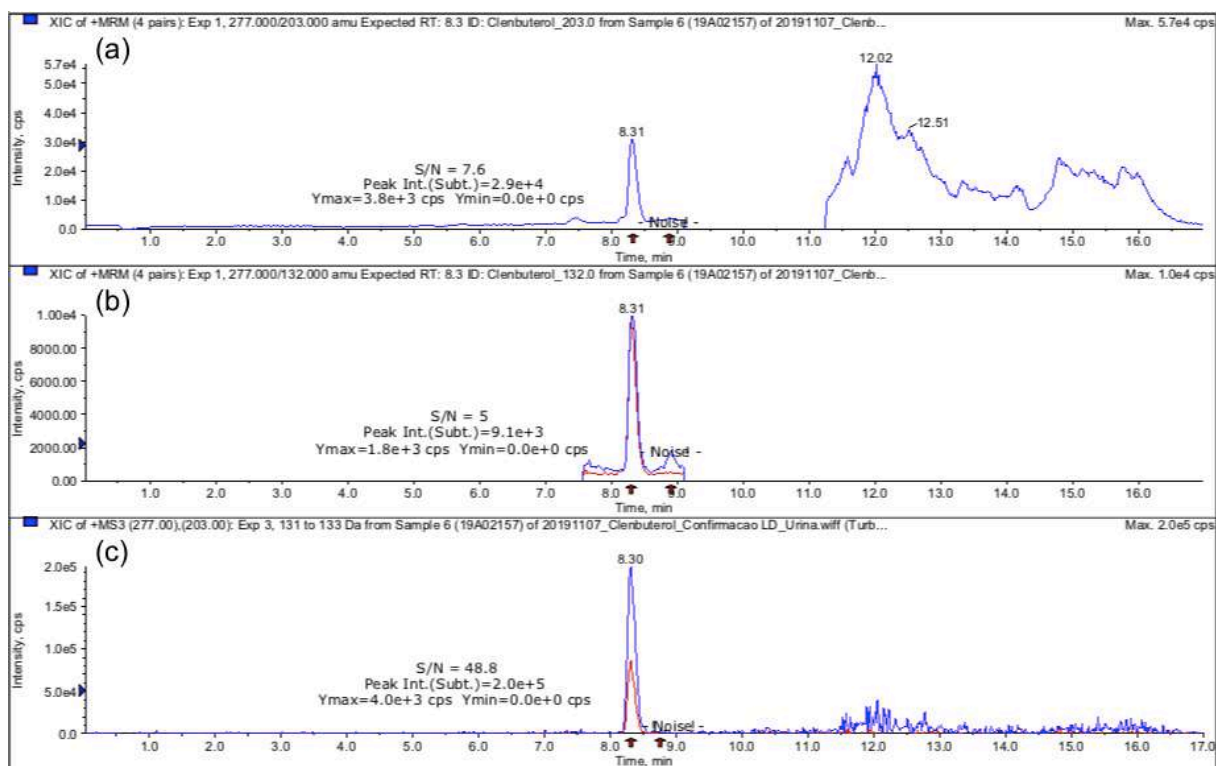




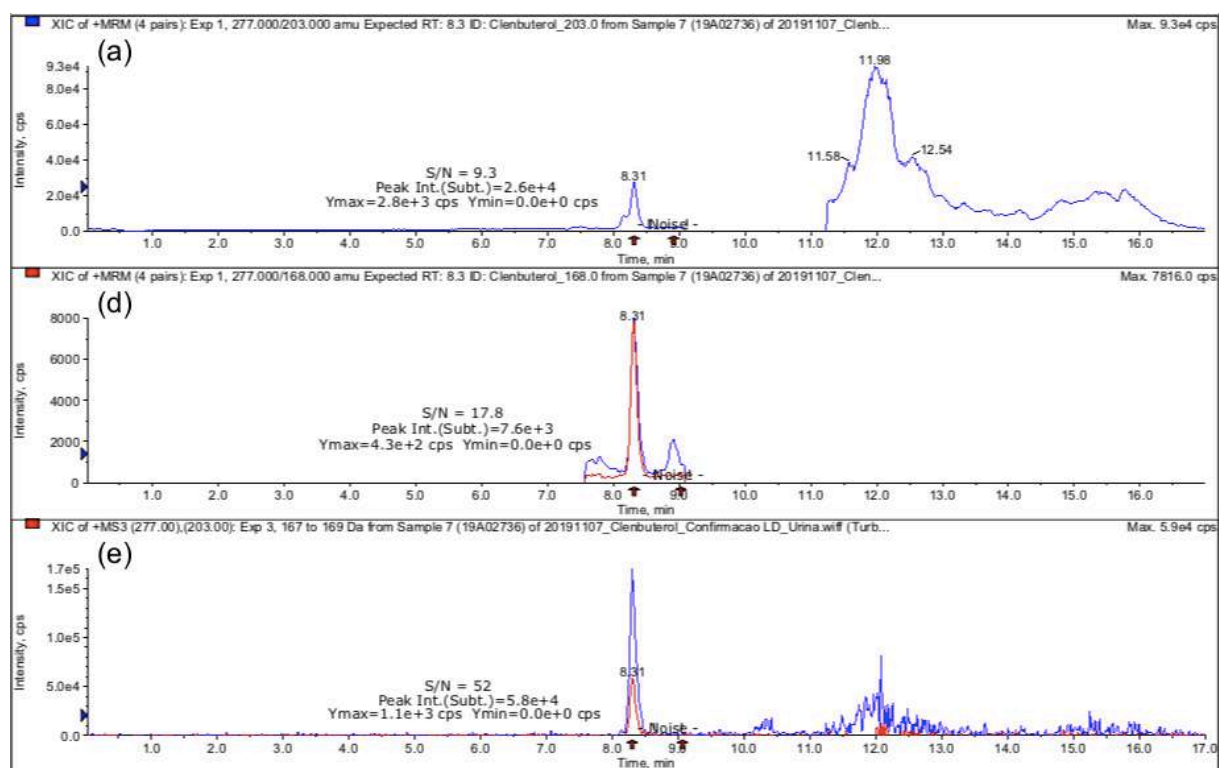
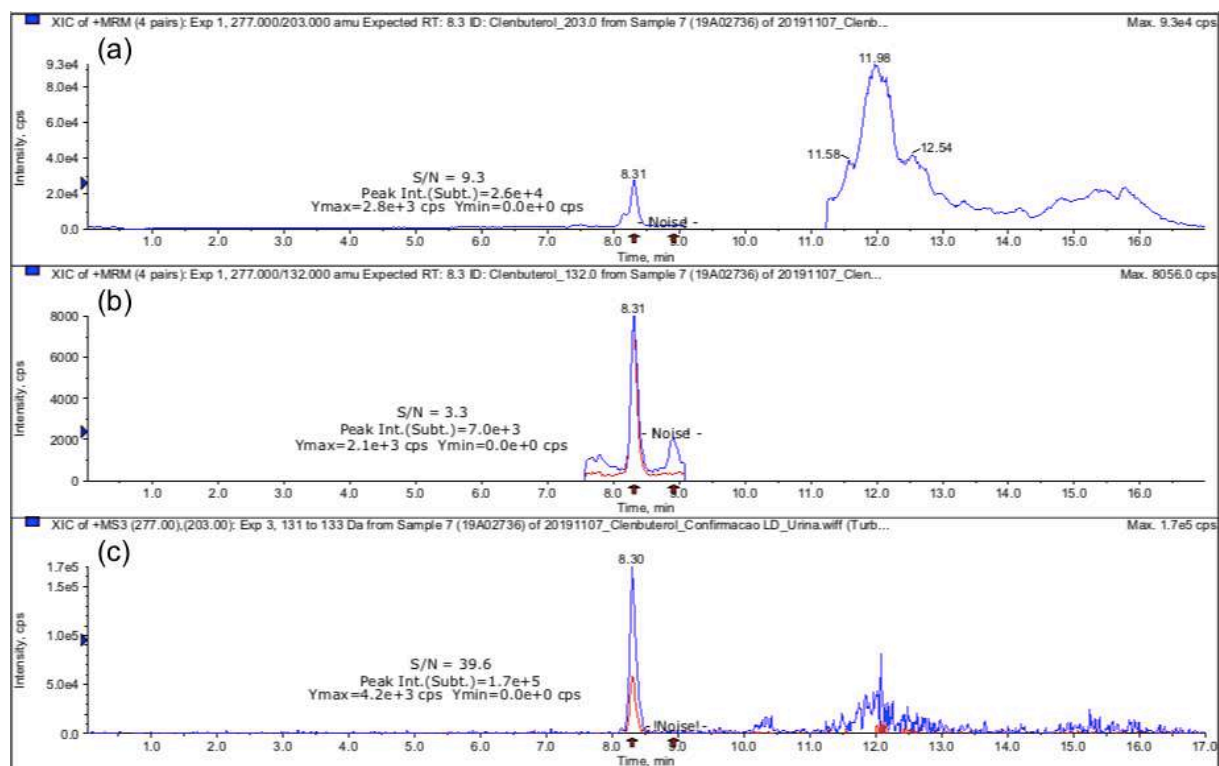
[4] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 04.



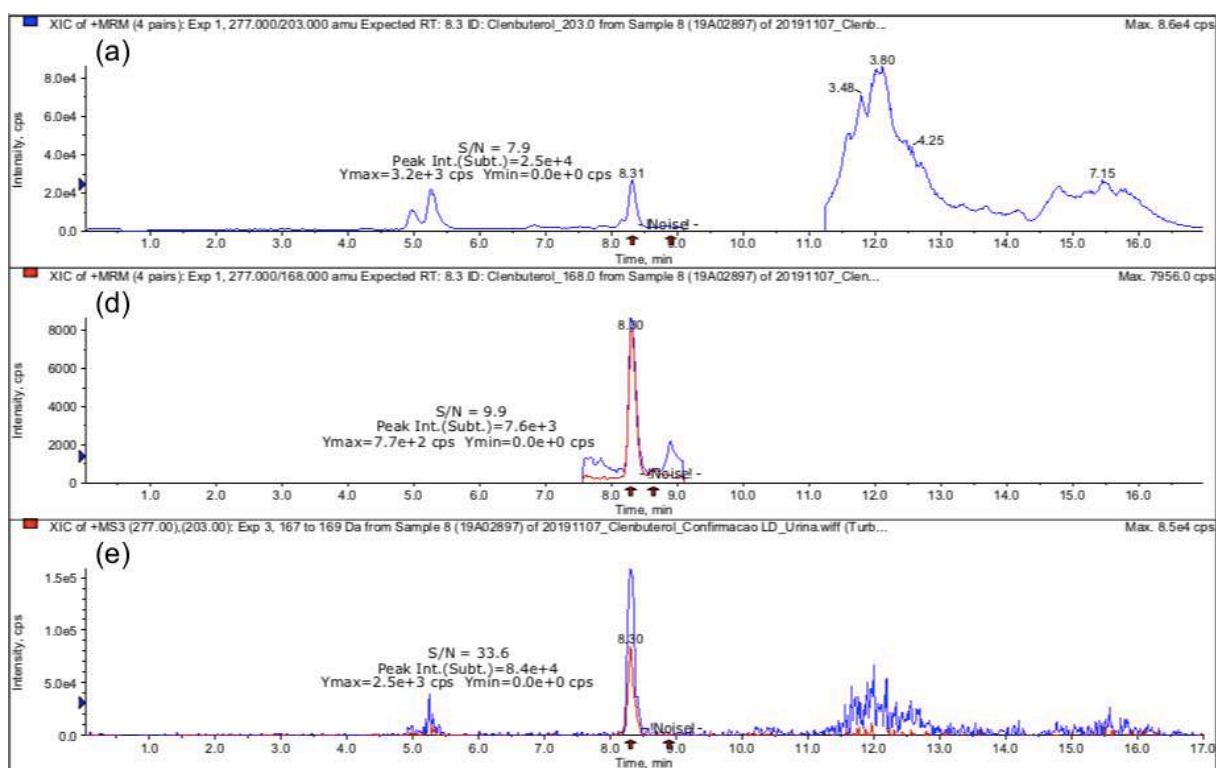
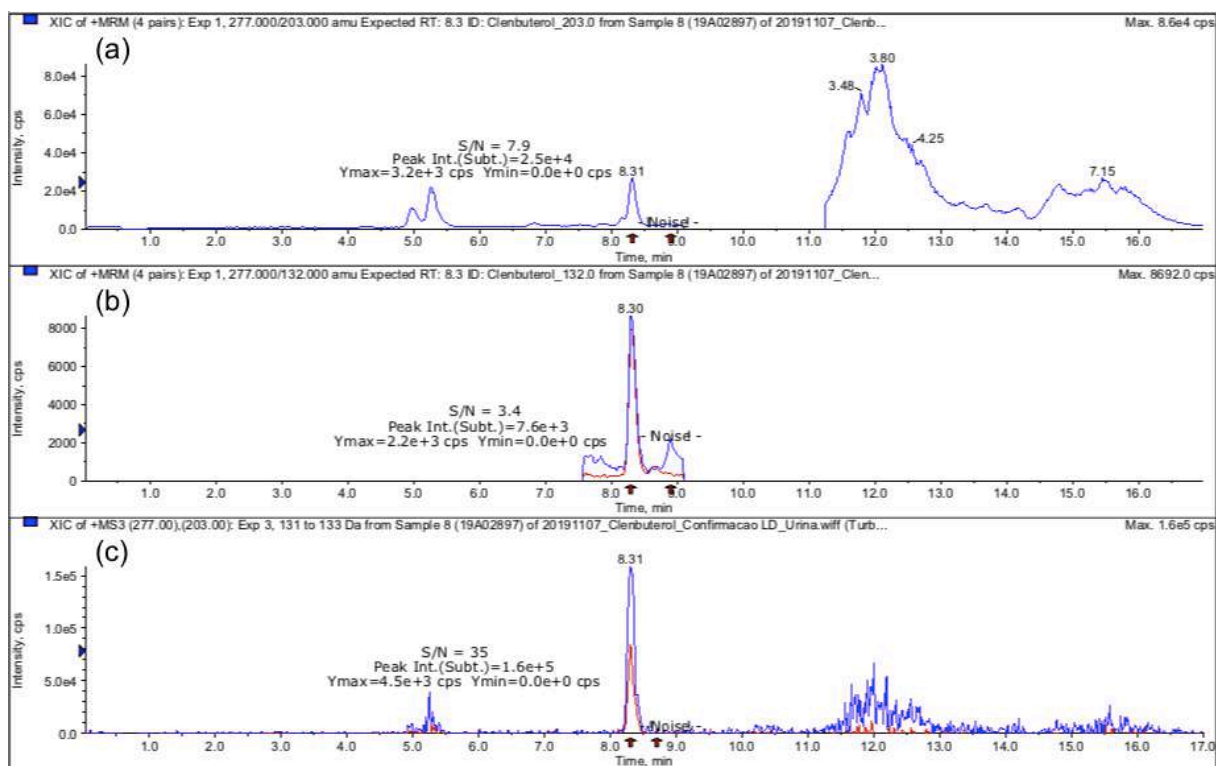
[5] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 05.



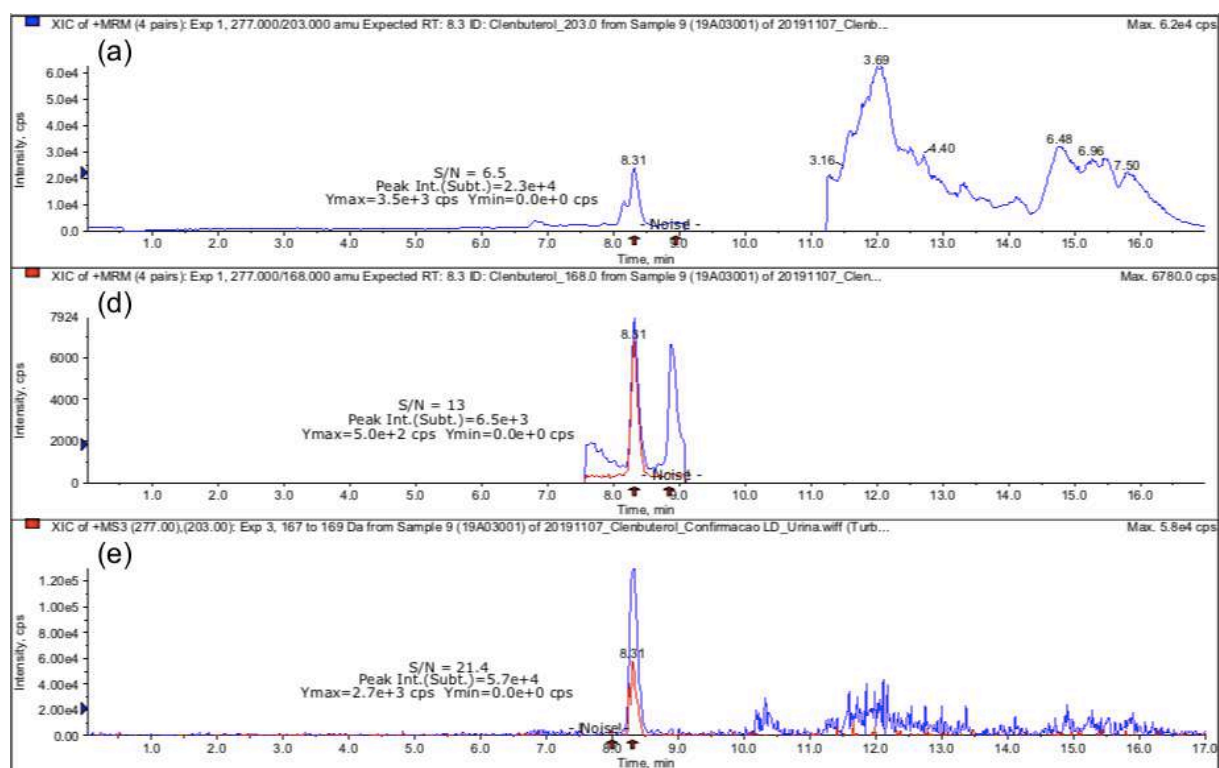
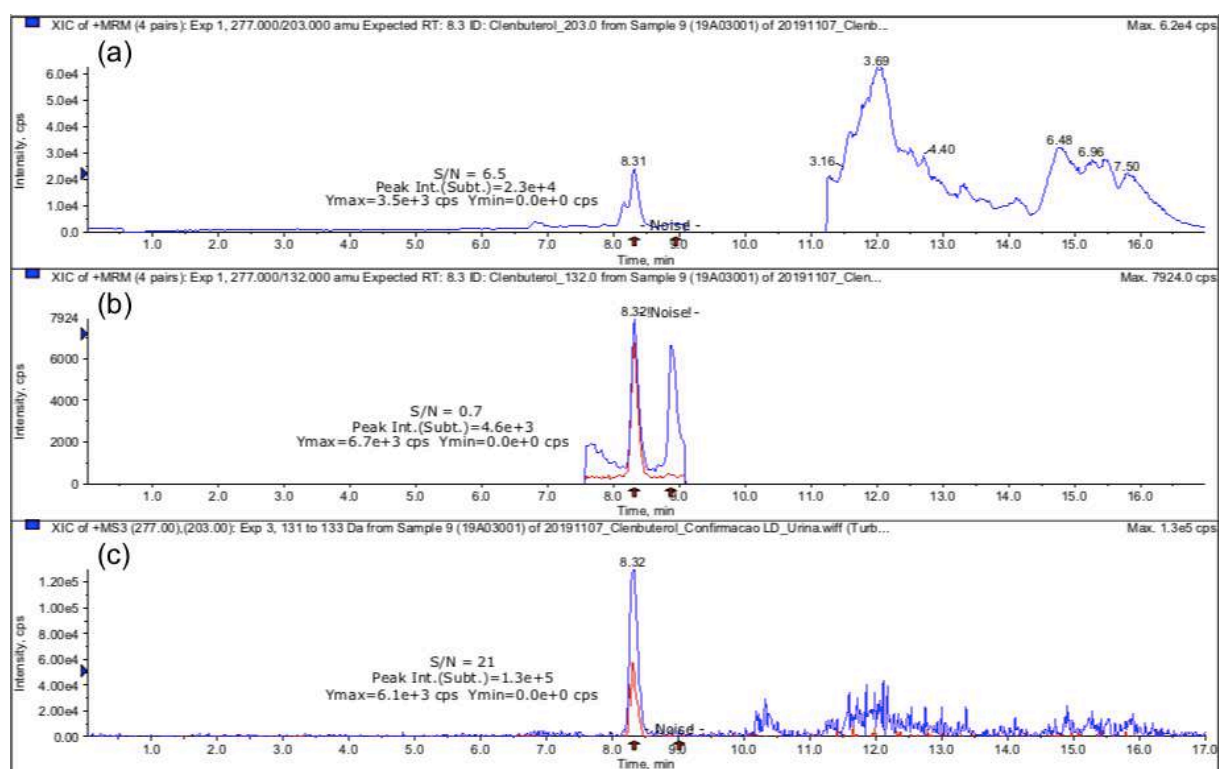
[6] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 06.



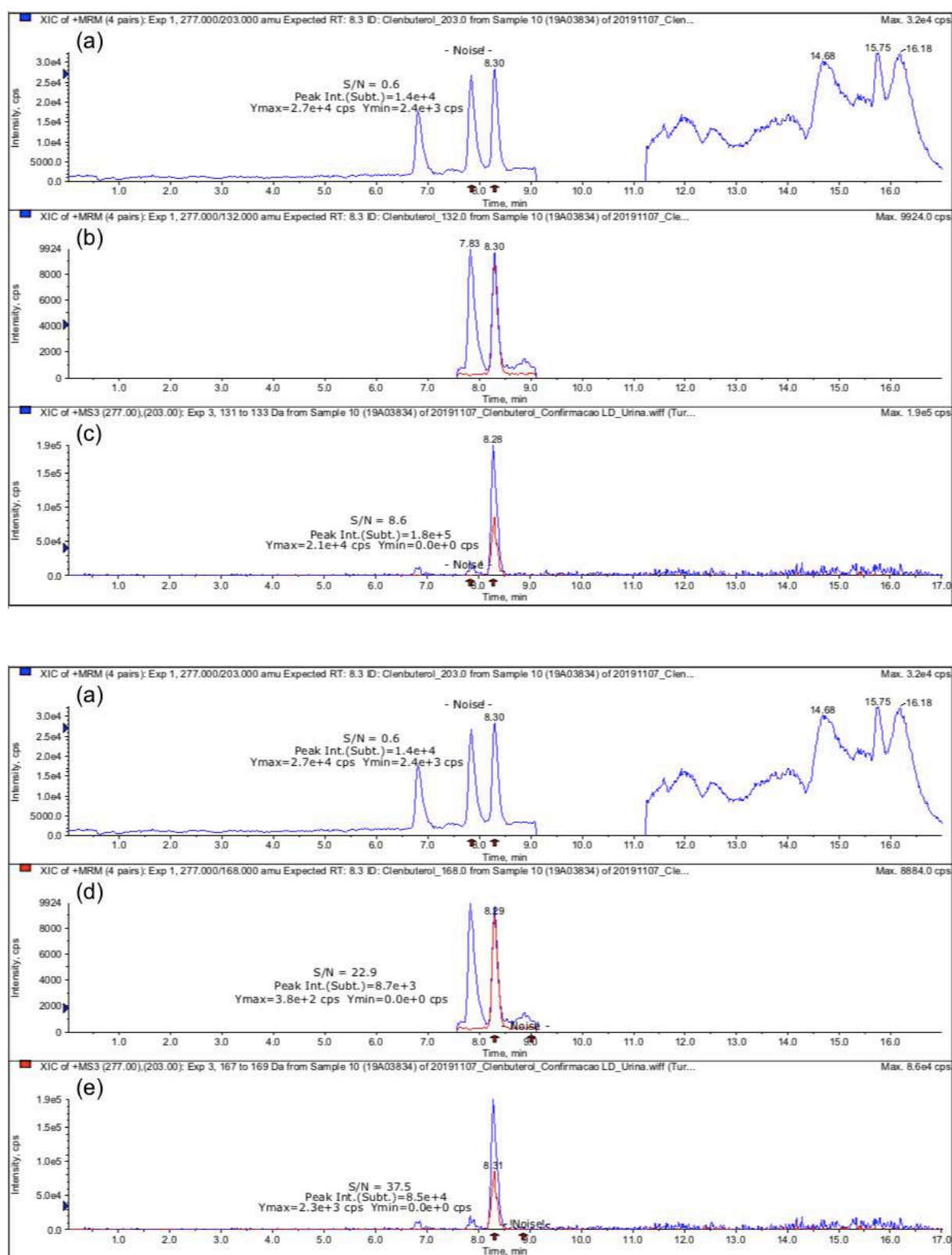
[7] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 07.



[8] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 08.



[9] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 09.



[10] Matriz: Urina (0,10 ng/mL) – Branco 10.

